

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS EN EL ÁREA
FARMACÉUTICA

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *BEAUVERIA BASSIANA* Y EVALUACIÓN DE LOS
NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN DE LA BEAUVERICINA SINTÉTICA EN UN CULTIVO SÓLIDO”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

JOSE NORBERTO VÁSQUEZ BONILLA

MATRÍCULA: 2161800613

COMITÉ TUTORAL

COTUTOR: DR. JUAN ESTEBAN BARRANCO FLORIDO

COTUTOR: DRA. MARIA ANGELICA GUTIERREZ NAVA

ASESOR: M en C. MARCELA HURTADO Y DE LA PEÑA

Junio 2018

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *BEAUVERIA BASSIANA* Y
EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN DE LA BEAUVERICINA
SINTETASA EN UN CULTIVO SÓLIDO**

Comité tutorial

Vo.Bo

Dr. Juan Esteban Barranco Florido

Vo.Bo

Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Vo.Bo

M en C. Marcela Hurtado y de la Peña

QFB. José Norberto Vásquez Bonilla

2161800613

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *BEAUVERIA BASSIANA* Y
EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN DE LA BEAUVERICINA
SINTETASA EN UN CULTIVO SÓLIDO**

Jurado del examen de grado

Vo.Bo Presidente

Dr. Alejandro Téllez Jurado

Vo.Bo Vocal

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Vo.Bo Secretario

M en C. Marcela Hurtado y de la Peña

QFB. José Norberto Vásquez Bonilla

2161800613

RESUMEN

La beauvericina, una micotoxina producida por algunas especies de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, tiene diversas actividades biológicas: antibacteriana, antifúngica, antiviral y especialmente antitumoral ya que posee un potencial terapéutico como agente anticanceroso en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Este tipo de hongos pueden desarrollarse en cultivos sólidos los cuales se ha observado poseen un gran potencial para la síntesis de metabolitos secundarios y compuestos bioactivos de interés farmacéutico.

En el presente estudio se realizó una identificación molecular de ocho hongos entomopatógenos, posteriormente se amplificó el gen *bbBeas* y con las secuencias obtenidas se realizó un análisis filogenético que muestra la similitud de este gen en diferentes especies de hongos entomopatógenos. Por otra parte se realizó un cultivo en estado sólido de *B. bassiana* con caparazón de camarón y se le determinó la expresión del gen *bbBeas* a los 6, 9 y 12 días de crecimiento para poder relacionar de manera indirecta los niveles de expresión con la producción de beauvericina también se realizó una semipurificación de la beauvericina a partir de los extractos de fermentación sólida utilizando una columna de tamiz molecular y una extracción en fase sólida.

Solamente en dos de las cuatro cepas identificadas como *B. bassiana* se logró amplificar el gen *bbBeas*. Esto es atribuido a su variabilidad genética, también se encontró que los niveles de expresión del gen *bbBeas* son mayores a los nueve días en un cultivo sólido, mientras que el análisis filogenético muestra una relación del gen *bbBeas* con genes de depsipéptidos sintetasa de otras especies de hongos posiblemente como resultado de un proceso evolutivo convergente. La semipurificación de la beauvericina indica que la mayor concentración de la beauvericina se encuentra en la fracción cuatro de la extracción en fase sólida. Estos datos sugieren que es adecuado detener el cultivo en estado sólido a los nueve días para la producción de metabolitos bioactivos como la beauvericina, siendo importante la evaluación de la expresión del gen *bbBeas* en cepas de *B. bassiana* debido al amplia variabilidad genética entre aislados.

ABSTRACT

Beauvericina, a mycotoxin produced by some species of entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana*, has several biological activities: antibacterial, antifungal, antiviral and antitumor, it has a therapeutic potential as an anticancer agent in *in vitro* and *in vivo* tests. These types of fungi can be developed in solid cultivation which have been observed to possess a great potential for secondary metabolites and bioactive compounds synthesis with pharmaceutical interest.

In this study, a molecular identification of eight entomopathogenic fungi was made, later the *bbBeas* gen was amplified with the sequences obtained a phylogenetic analysis was carried out showing the similarity of this gene in different entomopathogenic fungi species. Besides, a *B. bassiana* cultivation in solid state with shrimp shell was made and the *bbBeas* gene expression was determined within 6, 9 and 12 days of growth to link in an indirect way the expression levels with beauvericina production, also a beauvericina semi-purification was made starting with the solid fermentation extracts using a molecular sieve column and a solid phase extraction.

Only two of the four strains identified as *B. bassiana* amplify the *bbBeas* gen, this is attributed to the gen variability, it was also found that the *bbBeas* gene expression levels are bigger at nine days of culture, while the phylogenetic test shows the relation between the *bbBeas* gen and depsipeptide synthetase of other species of fungi, due to a convergent evolutionary process. The semipurification of beauvericina indicates that the biggest concentration of beauvericina is found in fraction four of the solid phase extraction. These data suggest that stopping the cultivation at solid state within nine days for the production of bioactive metabolites like beauvericina is suitable; being important the evaluation of the *bbBeas* gene expression in *B. bassiana* strains due to the broad genetic variability between isolates.

Agradecimientos Institucionales

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco que me permitió el uso de sus instalaciones para cursar la Maestría en Ciencias Farmacéuticas. La parte experimental de esta tesis se realizó en el laboratorio de Ecología microbiana y el laboratorio de Biotecnología en el Departamento de Sistemas Biológicos.

Agradezco a todo mi comité tutorial por su apoyo incondicional durante el desarrollo del proyecto.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 745861 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Agradecimientos personales

Esta tesis se la dedico a mis padres Irene Bonilla Méndez y Bulfrano Vásquez Reyes por su apoyo y por formarme como la persona que soy.

Gracias también a mis hermanos Jahir y Jactziri por su compañía, a mis papás institucionales el Dr. Juan Esteban Barranco Florido y la Dra. Angélica Gutiérrez Nava por su compromiso y dedicación.

Abreviaturas

HE: Hongos entomopatógenos

BEA: Beauvericina

RFLP: Análisis de los productos de digestión

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana

B. bassiana: *Beauveria bassiana*

M. anisopliae: *Metarhizium anisopliae*

M. robertsii: *Metarhizium robertsii*

I. javanica: *Isaria javanica*

I. fumosorosea: *Isaria fumosorosea*

D-HYIV: D-2-hidroxiisovalerato

L-Phe: L-fenilalanina

Hbu: Ácido DL-2-hexabutírico

RPMI: Medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute

MAPK: Mitogen-Activado por Protein Kinasas

PKA: Proteína kinasa A

RTKs: Receptor de Tirosina Kinasa

AMPc: Adenilil monofosfato cíclico

PDA: Agar dextrosa-papa

FES: Fermentación en estado sólido

FCCP: Carbonil-o-trifluorometoxifenilhidrazona

BEAS: Beauvericina sintetasa

BbBEAS: Beauvericina sintetasa en *B. bassiana*

bbBeas: Gen que codifica para la beauvericina sintetasa en *B. bassiana*

ES: Enniatina sintetasa

BS: Bassianolido sintetasa

PS: Péptido sintetasa

HP: Proteína hipotética

ABC: Área bajo la curva

EFS: Extracción en fase sólida

kDa: Kilodalton

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Hongos entomopatógenos	3
2.1.1 Proceso de infección de los HE	3
2.2 Métodos de identificación de HE	4
2.2.1 Identificación bioquímica	4
2.2.2 Análisis de los patrones de digestión	4
2.2.3 Regiones ITS y genes ribosomales	5
2.2.4 β -Tubulina	5
2.3 Metabolitos secundarios de HE.....	6
2.4 Beauvericina	7
2.4.1 Síntesis de la beauvericina	7
2.4.2 Producción de beauvericina.....	8
2.4.3 Purificación de la beauvericina.....	9
2.4.4 Actividad biológica de la beauvericina	9
2.4.4.1 Actividad insecticida de la beauvericina	9
2.4.4.2 Actividad antimicrobiana	10
2.4.4.3 Actividad antifúngica.....	10
2.4.4.4 Actividad antiviral	11
2.4.5 Actividad citotóxica de la beauvericina en ensayos <i>in vitro</i>	11
2.4.6 Actividad antitumoral de la beauvericina en ensayos <i>in vivo</i>	12
2.4.7 Mecanismo de acción de la beauvericina sobre células cancerígenas	12
2.4.7.1 MAP kinasas	13
2.4.7.2 Capacidad ionófora de la beauvericina	14
2.4.7.3 Proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas: Familia Bcl-2.....	15
2.4.7.4 Cambios en el potencial de membrana mitocondrial.....	15
2.5 Fermentación en estado sólido.....	16
2.5.1 Producción de compuestos bioactivos por fermentación en estado sólido.....	16
2.5.2 Ventajas de la fermentación en estado sólido	17
2.5.3 Caparazón de camarón	18
3. HIPÓTESIS.....	19
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos particulares.....	19

5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Microorganismo.....	20
5.1.1 Obtención de cultivos monoespóricos.....	20
5.1.2 Viabilidad	20
5.2 Condiciones del cultivo sólido.....	21
5.2.1 Tratamiento del caparazón	21
5.3 Identificación molecular	21
5.3.1 Extracción de ADN	21
5.3.2 Amplificación de las regiones ribosomales e ITS.....	23
5.3.2.1 Purificación de los productos de PCR	23
5.3.2.2 Secuenciación.....	24
5.4 Análisis bioinformático	24
5.4.1 Amplificación parcial del gen <i>bbBeas</i>	24
5.4.2 Construcción del árbol filogenético y alineamiento de aminoácidos	25
5.5 Amplificación y secuenciación del gen <i>bbBeas</i>	25
5.6 Extracción y purificación del RNA total	26
5.7 RT-PCR.....	27
5.8 Cuantificación por densitometría	28
5.9 Purificación de la beauvericina	28
5.9.1 Obtención del extracto de fermentación	28
5.9.2 Semipurificación de los metabolitos secundarios de <i>B. bassiana</i>	28
5.9.4 Análisis cromatográfico.....	30
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1 Extracción de ADN	30
6.2 Viabilidad.....	32
6.3 Identificación molecular	33
6.4 Amplificación parcial del gen <i>bbBeas</i>	39
6.4.1 Traducción de los amplificados del gen <i>bbBeas</i>	45
6.4.2 Filogenia.....	49
6.5 Niveles de expresión del gen <i>bbBeas</i> en cultivo sólido.....	50
6.6 Purificación de la beauvericina	54
7. CONCLUSIONES.....	61
8. BIBLIOGRAFÍA.....	62

9. ANEXOS.....	75
-----------------------	-----------

1. INTRODUCCIÓN

La BEA es una reconocida micotoxina de la familia de compuestos conocida como depsipéptidos cíclicos y es producida por algunos hongos como *B. bassiana* y *Fusarium spp.* (Wang & Xu, 2012) y es sintetizada por una vía no ribosomal propia de los hongos mediante la enzima beauvericina sintetasa la cual está codificada por el gen *bbBeas* en la especie *B. bassiana* y lleva a cabo la biosíntesis utilizando D-HYIV y L-Phe como sustratos (Wang & Xu 2012; Jiang *et al.*, 2013). La beauvericina ha mostrado poseer gran variedad de actividades biológicas como: insecticida, antibacteriana, antifúngica, antiviral y antitumoral (Grove & Pople 1980; Castlebury *et al.*, 1999; Ganassi *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2009; Meca *et al.*, 2010; Wang & Xu, 2012) debido a que el cáncer es la primera causa de muerte a nivel mundial con 8.2 millones de defunciones en 2012 y en México ocupa el segundo lugar como causa de muerte (2007) (Ríos *et al.*, 2015), ha incrementado el interés en el estudio de la BEA como agente antitumoral por su efecto citotóxico en gran variedad de células cancerosas, disminución de peso y tamaño de tumores en ensayos *in vivo* (Cheng *et al.*, 2009; Heilos *et al.*, 2017) y por sus interesantes mecanismos de acción propuestos como: aumento intracelular de calcio, participación de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas, liberación del citocromo C, MAP kinasas entre otros (Kouri *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2005; Wätjen *et al.*, 2014).

La producción de BEA se lleva a cabo mediante cultivos líquidos también conocidos como cultivos sumergidos de hongos productores de BEA y para su purificación se aprovechan sus propiedades fisicoquímicas por lo que generalmente se utilizan extracciones en fase sólida previas a la purificación por HPLC preparativo (Meca *et al.*, 2010; Valencia *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013)

El cultivo en estado sólido es un medio de cultivo de bajo costo que posee una alta productividad de compuestos bioactivos donde los microorganismos invaden materiales sólidos insolubles e inertes que poseen cierto grado de humedad (Ruiz-Leza *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2013). Diferentes estudios ponen en evidencia la capacidad del cultivo en estado sólido para producir compuestos bioactivos de valor agregado como: enzimas, metabolitos secundarios, antibióticos, pigmentos, ácidos

orgánicos, alcaloides, factores de crecimiento, compuestos aromáticos entre muchos otros (Singhania *et al.*, 2009; Nagavalli *et al.*, 2015; Farinas, 2015; Gonçalves *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Pérez-Sánchez *et al.*, 2017) y posee numerosas ventajas frente a la fermentación líquida o sumergida además de que al llevarse a cabo en birreactores pequeños y cerrados facilita el escalamiento a nivel industrial (Martins *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2013; Behera & Ray, 2016). Sin embargo, este tipo de cultivo no se ha utilizado para la producción de BEA.

Los hongos HE son aquellos que infectan diferentes ordenes de insectos causándoles micosis y la muerte (Rondot & Reineke 2016). En el presente trabajo se identificaron molecularmente cepas de HE para asegurar que se trataran de especies de HE productoras de beauvericina, posteriormente se identificó y amplificó el gen *bbBeas* para evaluar sus niveles de expresión en un medio de cultivo en estado sólido, con la finalidad de tomar como indicativo el tiempo de cultivo donde se expresa más el gen *bbBeas* con la mayor producción de BEA, por otro lado utilizando las secuencias obtenidas del gen *bbBeas* y otras secuencias ya reportadas en la base de datos del GenBank de diferentes genes homólogos se realizó un árbol filogenético y un alineamiento de sus secuencias traducidas a aminoácidos finalmente se realizó una semipurificación de la BEA a partir de una fermentación en estado sólido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Hongos entomopatógenos

Los HE son aquellos que parasitan diferentes órdenes de insectos por lo que son enemigos naturales de las plagas en los ecosistemas agrícolas lo que los convierte en candidatos de un manejo sustentable de plagas (Meyling *et al.*, 2007; Rondot & Reineke 2018) y una alternativa más a los insecticidas químicos, ya que los HE no causan resistencia en las plagas ni contaminan los alimentos obtenidos como lo hacen los insecticidas químicos (Fernandes & Bittencourt 2008), lo que ha derivado en la formulación y comercialización de bioinsecticidas a base de conidios de HE especialmente de las especies *B. bassiana* y *M. anisopliae* (Faria & Wright 2007).

2.1.1 Proceso de infección de los HE

El proceso de infección de los HE inicia con una adhesión del conidio con la cutícula externa del insecto mediante diferentes interacciones de componentes encontrados tanto en el conidio como en la cutícula mediante interacciones no covalentes como electrostáticas o hidrofóbicas, una vez anclado el hongo al insecto mediante la síntesis de diferentes enzimas líticas penetra la cutícula para tener acceso a los nutrientes de la hemolinfa los cuales activan la vía de señalización responsable de la síntesis de gran variedad de metabolitos secundarios por lo que empiezan a ser sintetizados en esta etapa de la infección, finalmente estos metabolitos causarán la muerte al insecto, mientras el hongo produce metabolitos secundarios también aumenta la expresión genes antioxidantes que ayudan al hongo a resistir el estrés oxidativo, ocasionado por el sistema inmune del insecto por otra parte los HE también han desarrollado otras estrategias para evadir el sistema inmune de los insectos como cambiar su estructura celular a blastoesporas o a cuerpos hifales que hacen al hongo más resistente a diversos factores o que lo enmascaran haciéndolo imperceptible frente al sistema inmune del insecto (Pucheta *et al.*, 2006; Pedrini *et al.*, 2007; Dubovskiy *et al.*, 2013 Mascarin *et al.*, 2016; Lai *et al.*, 2017).

2.2 Métodos de identificación de HE

La identificación molecular de especies de HE resulta de gran importancia para reconocer e identificar las especies candidatas a ser una alternativa biológica a los insecticidas (Rehner & Buckley 2005), así como para diferenciar especies cercanas que no pueden ser distinguida mediante identificación morfológica o bioquímica ya que la identificación molecular se basa en la amplificación y secuenciación de diferentes partes del genoma características y únicas de cada especie, por lo que son una herramienta fiable para la identificación de especies (Santos & Linardi 2003; Al-hemaid *et al.*, 2014)

2.2.1 Identificación bioquímica

La identificación bioquímica se basa en las características tintoriales, morfológicas y bioquímicas de los microorganismos tomando las habilidades de estos para producir enzimas o metabolitos fácilmente detectables, los cuales son característicos de una especie o grupo de especies ya que cada una de estas modifican de manera característica el ambiente que las rodea mediante la captación de sustancias necesarias para su crecimiento. Estas reacciones bioquímicas producto de las interacciones microorganismo-medio de cultivo dependen del metabolismo de cada microorganismo lo que lo hace una herramienta útil para la identificación y clasificación de microorganismos (Farmer *et al.*, 1985; Santos & Linardi, 2003).

2.2.2 Análisis de los patrones de digestión

El análisis de los patrones de digestión se trata de un método de identificación de especies en que ha sido desplazado por otros métodos de identificación más fiable como los métodos moleculares, sin embargo, aún tiene importancia en la tipificación de aislados. Se basa en el reconocimiento de secuencias particulares y/o polimórficas para cada especie, para amplificarlas mediante PCR y posteriormente la digestión de estos productos mediante enzimas de restricción generando patrones de bandas (una serie de bandas de un tamaño medible) para cada una de las enzimas de restricción los patrones de bandas pueden ser distinguidos por electroforesis de gel de agarosa, sin embargo, los fragmentos originados no son claramente diferenciados en el gel de

agarosa ya que es necesario que las longitudes entre fragmentos sea lo suficientemente grande para que exista un diferente grado de migración en el gel de agarosa, por otra parte no se pueden conocer los cambios en el genoma de estos fragmentos, porque no se realiza una secuenciación además de que más de una especie puede originar los mismo o muy similares patrones de digestión originando una identificación errónea de especies (Llorens *et al.*, 1997; Poczai *et al.*, 2013).

2.2.3 Regiones ITS y genes ribosomales

Las secuencias ITS son secuencias que separan los genes ribosomales entre sí (figura 1) y debido a su alta conservación y a que son diferentes entre especies resulta útil su amplificación y secuenciación junto con la de los genes ribosomales para la identificación molecular de especies. Este método al identificar las especies a nivel molecular puede diferenciar especies que no pueden ser diferenciadas mediante identificación morfológica y bioquímica, también tiene ventaja frente a otros métodos de identificación molecular debido a que los genes ribosomales y las secuencias ITS se encuentran en gran cantidad de copias en el genoma lo que facilita su amplificación, por lo que son ampliamente utilizadas para la identificación molecular de especies y nos brindan la posibilidad de tener una base de datos universal para tener un contexto de comparación (Huang *et al.*, 2009; Al-hemaid *et al.*, 2014).

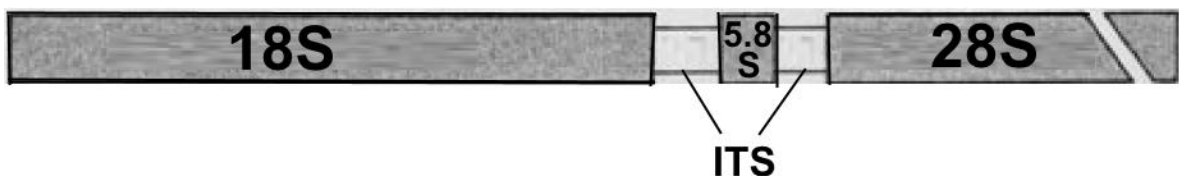


Figura1: Genes ribosomales y regiones ITS. Modificada de White 1990.

2.2.4 β -Tubulina

Las tubulinas son una familia de proteínas que está formada por las tubulinas alfa (α), beta (β) y gamma (γ) y comparten una similitud de hasta el 40% entre ellas. Las tubulinas alfa y beta son subunidades esenciales de los microtúbulos de las células

eucariontes y se originaron hace 1500 millones de años junto con las células eucariontes por lo que tienen un origen muy antiguo lo que ha ocasionado que los sus genes presenten una gran divergencia de una especie a otra, sin embargo, esta divergencia evolutiva solo se presenta en el sitio del gen que codifica para el extremo C terminal de las tubulinas alfa y beta ya que el resto del cuerpo de las tubulinas está fuertemente conservado, para llevar a cabo de forma correcta su función. Debido a esta divergencia evolutiva la amplificación y secuenciación de los genes de las tubulinas alfa y beta es un método, ampliamente utilizado para la identificación molecular de especies posee ventaja frente a los métodos de identificación morfológica y bioquímica por diferenciar las especies a nivel molecular, sin embargo, la amplificación de estos genes es más complicada a comparación de los genes ribosomales y secuencias ITS ya que los genes de las tubulinas no se encuentran en gran cantidad de copias en el genoma como sucede con los genes ribosomales y secuencias ITS (Llanos *et al.*, 1999; Oakley, 2000).

2.3 Metabolitos secundarios de HE

Se trata de compuestos orgánicos sintetizados por los HE que no poseen un rol directo en el crecimiento del hongo pero si en su proceso infectivo ya que son sintetizados durante este y provocan la muerte al insecto (Pucheta *et al.*, 2006).

Los metabolitos secundarios de HE muestran tener un complejo proceso de producción el cual está ligado a señales de transcripción que regulan los genes responsables de la síntesis de estos metabolitos, estas señales de transcripción son producto de cascadas de señalización de tipo proteína kinasa A dependiente de AMPc y de tipo MAPK, las cuales están mediadas por receptores anclados a proteínas G los cuales son activados por nutrientes disponibles en las diferentes etapas de infección del hongo (Barranco *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2017). Los metabolitos secundarios mejoran la adaptabilidad del hongo en su entorno natural y su desarrollo durante su proceso infectivo (Carollo *et al.*, 2010), en muchos casos la función de los metabolitos secundarios es desconocida, sin embargo, se han elucidado y aislado varios de ellos como enniatinas, beauvericina, basianoloides, oosporeina, destruxinas

A, B y E, serinociclinas entre otros mostrando interesantes actividades biológicas (Gonzalez *et al.*, 2007; Carollo *et al.*, 2010; Sivanathan & Scherkenbeck, 2014).

2.4 Beauvericina

La beauvericina (figura 2) es una micotoxina de la familia de los depsipéptidos cíclicos producida por varios hongos, tales como *B. bassiana* y *Fusarium spp.* (Wang & Xu, 2012) contiene en su estructura tres residuos de D-HYIV y tres residuos de metilfenilalanina de forma alternada, es estructuralmente similar a las enniatinas pero poseen actividad biológica diferente (Meyling & Eilenberg, 2007).

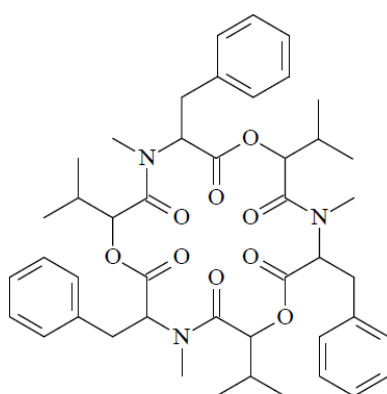


Figura 2. Molécula de la Beauvericina. Tomada de Wang & Xu, 2012.

2.4.1 Síntesis de la beauvericina

La síntesis de la beauvericina se lleva a cabo por un mecanismo no ribosomal propio de los hongos, el cual se basa en la unión aminoácidos fuera de un ribosoma mediante una enzima en el caso de la beauvericina la enzima es la BEAS la cual requiere de una fuente rica en nitrógeno y una de carbono y posee un peso molecular de 351 kDa y lleva a cabo la biosíntesis utilizando D-HYIV y L-Phe como sustratos, (figura 3) (Wang & Xu, 2012). Sin embargo, debido a la variabilidad genética del gen que codifica para esta enzima y a la similitud de esta con otras enzimas responsables de la síntesis de diferentes depsipéptidos. Existen otras depsipéptidos sintetetasas, las cuales difieren con la beauvericina sintetetasa en cuanto a la selectividad de los sustratos especialmente del aminoácido y preferentemente aceptan N-metil-L-fenilalanina y algunos otros aminoácidos con cadenas alifáticas hidrofóbicas lo que da

lugar a seis análogos de beauvericina (Wang & Xu, 2012) por otro lado si se utiliza el Hbu y la DL-3-fluorofenilalanina como sustratos se obtienen seis derivados de la beauvericina lo que disminuye la disponibilidad de sustratos para la síntesis de BEA y con ello su producción. (Sivanathan & Scherkenbeck, 2014).

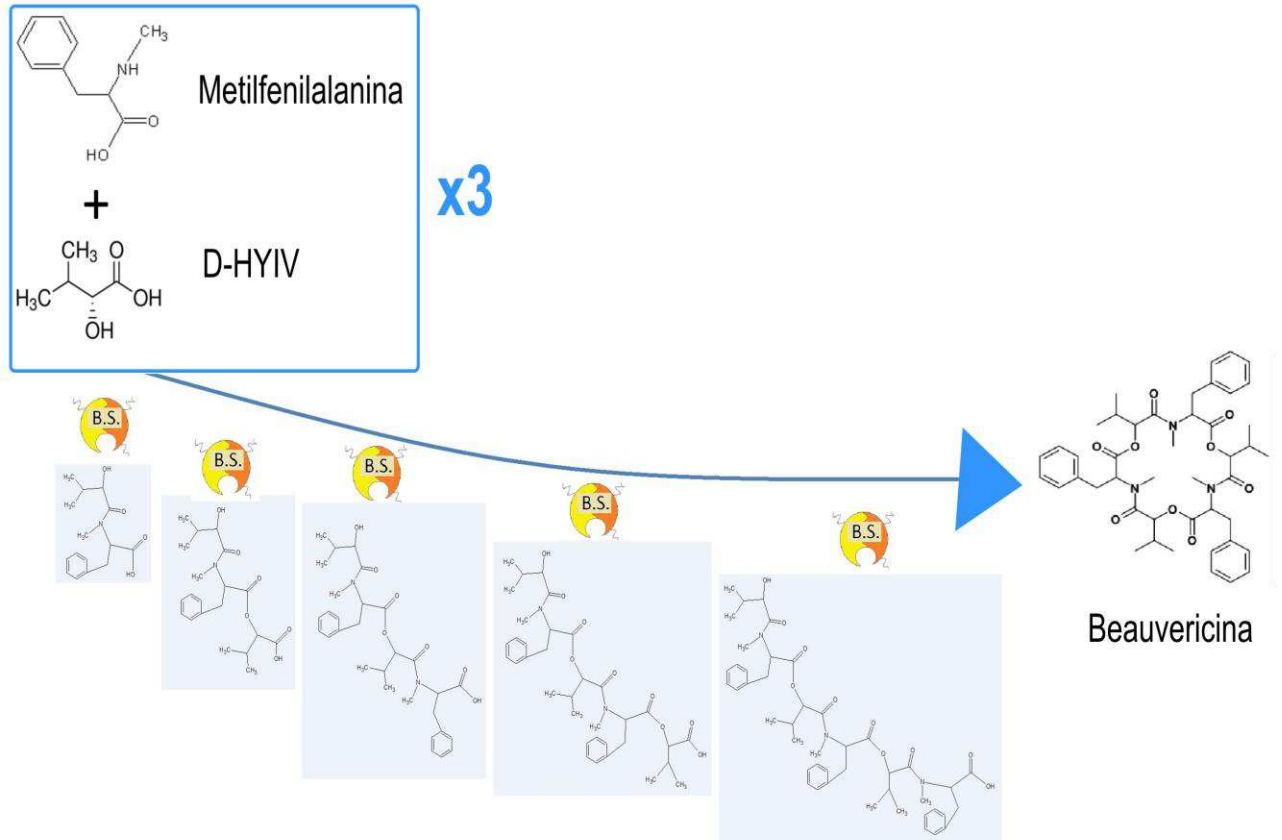


Figura 3. Síntesis de beauvericina. Representación esquemática que muestra la vía no ribosomal de síntesis de la BEA, catalizada por la enzima BEAS tomando como sustratos la metilfenilalanina y D-2-hidroxiisovalerato.

2.4.2 Producción de beauvericina

Se ha reportado la producción de BEA a partir de cultivos en estado líquido, sin embargo, su producción mediante este tipo de cultivo requiere mantener condiciones asépticas, extracción de los productos de fermentación y mantener en buen funcionamiento los biorreactores que suelen ser de gran tamaño lo que implica un proceso costoso, por otra parte se utiliza una gran cantidad de medio de cultivo para producir pequeñas cantidades de BEA la cual finalmente resulta difícil de purificar por

lo que su producción es muy costosa si se produce en un medio líquido o sumergido (Grove & Pople, 1980; Shin *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2012).

2.4.3 Purificación de la beauvericina

Los procesos de purificación aprovechan las características fisicoquímicas de los depsipéptidos por lo que se utilizan solventes no polares los cuales se mezclan con medio cultivo o fermentación para extraerlos, posteriormente se separan los restos sólidos del solvente mediante centrifugación o filtración, después los metabolitos extraídos se someten a una EFS usando una columna de sílica con el fin de separar los componentes polares previamente obtenidos de acuerdo a su grado de polaridad, en diferentes estudios comparten que el último método de purificación y aislamiento de BEA es el HPLC preparativo y que posterior a esto se necesita un detector para su correcta identificación los cuales en la mayoría de los casos se utilizan anclados al cromatógrafo y son MS o resonancia magnética (Logrieco *et al.*, 2002; Yiping *et al.*, 2007; Meca *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2013; Rachmawati *et al.*, 2018).

2.4.4 Actividad biológica de la beauvericina

2.4.4.1 Actividad insecticida de la beauvericina

La producción de la beauvericina y otros metabolitos secundarios ocurre cuando el HE llega a la hemolinfa del insecto y se distribuye ampliamente en el cuerpo causando toxicidad y finalmente provocar la muerte del insecto, como resultado de su actividad insecticida (Whang & Xu, 2012).

La primera vez que se demostró que la beauvericina poseía esta actividad biológica fue en el año de 1969 por Hamill *et al.*, quienes utilizaron a *Artemia salina* como organismo modelo para estudiar su actividad insecticida (Hamil *et al.*, 1969), posteriormente se han realizado diferentes estudios que demuestran la actividad insecticida de la BEA en organismos modelos como *Calliphora erythrocephala*, *Aedes aegypti* y *Schizaphis graminum* entre otros donde se observa que la BEA posee mayor actividad insecticida en comparación a un grupo al cual se le administró otros metabolitos secundarios de *B. bassiana* como eniantinas y análogos de beauvericina y frente a un grupo control (Grove & Pople, 1980; Ganassi *et al.*, 2002).

2.4.4.2 Actividad antimicrobiana

A diferencia de muchos antibióticos que bloquean la biosíntesis de peptidoglicano en las bacterias, los mecanismos por los cuales la BEA tiene efecto antimicrobiano no están relacionados con la biosíntesis de peptidoglicano (Wang & Xu, 2012). Ha demostrado su actividad antimicrobiana en diferentes estudios en contra de bacterias patógenas como: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteriae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* donde concentraciones variables de BEA inhiben el crecimiento de estas bacterias tanto en medios líquidos como en sólidos. Los mecanismos de acción de cómo la BEA posee efecto antimicrobiano permanecen sin elucidar pero se ha propuesto que actúa en los ribosomas o a nivel del ADN ya que también posee efecto antifúngico y porque no distingue entre bacterias Gram positivas y Gram negativas, lo que sugiere que su mecanismo de acción no inhibe la síntesis de peptidoglicano (Castlebury *et al.*, 1999; Meca *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011; Wang & Xu, *et al.*, 2012).

2.4.4.3 Actividad antifúngica

Se ha demostrado que la beauvericina posee un fuerte efecto de sinergismo al aplicarse en conjunto con concentraciones subinhibitorias de ketoconazol, ya que aumentó considerablemente la supervivencia de ratones inmunosuprimidos infectados por hongos patógenos oportunistas como *Candida parapsilosis*, además disminuyó el número de UFC de esta especie de hongo en diversos órganos como riñones, pulmones y cerebro; y tales efectos no se observaron en los grupos a los que solamente se les administró concentraciones terapéuticas de ketoconazol. El mecanismo de acción de cómo la BEA produce un efecto sinérgico no se ha elucidado pero se relaciona con bloquear la entrada y salida de sustancias a la célula fúngica (Zhang *et al.*, 2007), por lo que la beauvericina administrada en conjunto con otros fármacos antimicóticos puede dar lugar a nuevas terapias antimicóticas efectivas contra diferentes especies de hongos patógenos.

2.4.4.4 Actividad antiviral

En el tratamiento de enfermedades retrovirales, como en el caso del virus del VIH-1, se ha encontrado que la beauvericina es un potente y selectivo inhibidor de la integrasa del VIH-1, sin embargo, su mecanismo de acción todavía no se ha comprendido. En comparación con las enniatinas la concentración inhibitoria (CI₅₀) de beauvericina requerida para inhibir la integrasa del VIH-1 es hasta 10 veces menor; sin embargo, la beauvericina y los otros depsipéptidos cíclicos no ejercen efecto inhibitorio en contra de la transcriptasa reversa (Shin *et al.*, 2009). Debido a que hasta ahora no se ha encontrado un inhibidor selectivo para la integrasa del VIH-1, se puede considerar a la beauvericina como una prometedora molécula en el tratamiento del VIH-1 en conjunto con otros fármacos antirretrovirales.

2.4.5 Actividad citotóxica de la beauvericina en ensayos *in vitro*

La actividad citotóxica de la BEA se ha demostrado mediante ensayos *in vitro* en diferentes líneas celulares de cáncer como: leucemia linfoblástica humana CCRF-CEM, carcinoma epidermoide KB y KBv200, cáncer de mama BC-1 y cáncer de mama metastásico MDA-MB-231, cáncer de pulmón de células no pequeñas A549, cáncer de próstata metastásico PC-3M, melanoma humano MDA-MB43, cáncer de colon humano HCT-8 y HCT116, cáncer cerebral SF295, hepatoma de rata H4IIE, hepatoma humano HepG2, entre otras. Sin embargo, no se ha elucidado un mecanismo de acción de cómo la BEA lleva a cabo la apoptosis celular, aunque se han propuesto varios, ninguno de estos es específico para una línea celular en particular.

Entre los mecanismo de acción propuestos resaltan: la activación de diferentes MAP kinasas, regulación de las proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas, cambios en el potencial de membrana mitocondrial, liberación del citocromo C, aumento intracelular de calcio y activación de caspasas, aunque ninguno de estos está relacionado únicamente a un tipo de línea celular cancerosa. (Nilanonta *et al.*, 2002; Jow *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Whang *et al.*, 2011; Do Nascimento *et al.*, 2012; Wätjen *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016).

2.4.6 Actividad antitumoral de la beauvericina en ensayos *in vivo*

La beauvericina ha demostrado actividad antitumoral en modelos murinos demostrando. Sin embargo, sólo se han reportado dos ensayos *in vivo* de la actividad antitumoral de la beauvericina, empleando modelos murinos. En los dos ensayos *in vivo* se encuentra una disminución significativa del tamaño y peso de los tumores, en el primer ensayo *in vivo* se realizó con ratones desnudos de cinco semanas de edad a los cuales se les administró por vía subcutánea células de retinoblastoma Y79 (2×10^6 células), usando como vehículo 200 μ L de solución salina. Para el tratamiento canceroso de retinoblastoma se administró semanalmente una solución 3 μ M de beauvericina alrededor de la zona del tumor durante un periodo de 8 semanas. Los resultados evidenciaron que el peso y tamaño del tumor extraído disminuyó significativamente respecto al grupo control (Cheng *et al.*, 2009).

El segundo ensayo *in vivo* realizado fue llevado a cabo utilizando ratones BALB/c y CB-17/SCID de 6 a 8 semanas de edad a los cuales se les administró por vía subcutánea células de carcinoma de colon de un modelo murino CT26 (4×10^5 células) y células humanas de carcinoma cervical KB3-1 (1×10^6 células), respectivamente, utilizando como vehículo medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). Para el tratamiento de ambos carcinomas se administraron intraperitonealmente 5 mg de beauvericina por kilogramo de peso del roedor diariamente durante dos ciclos, el primer ciclo de 5 días y el segundo de 4 días con dos días entre el primer y segundo ciclo. Los resultados evidenciaron que en ambos casos de carcinoma el peso y tamaño del tumor extraído disminuyó significativamente respecto al grupo control, también se encontraron áreas necróticas y aumentó en la fragmentación del ADN dentro de los tumores (Heilos *et al.*, 2017).

2.4.7 Mecanismo de acción de la beauvericina sobre células cancerígenas

Aunque se han propuesto diversos mecanismos de acción de como la beauvericina causa apoptosis en células cancerosas y disminuye el tamaño de los tumores en ensayos *in vivo* aún requieren ser dilucidados con mayor detalle, además que no se ha propuesto un mecanismo único para cada línea celular cancerosa (Rios *et al.*,

2015; Heilos *et al.*, 2017). Entre los mecanismos propuestos destacan la capacidad de modificar las concentraciones iónicas intracelulares, modificación de las funciones celulares, inducción de apoptosis mediante la vía mitocondrial, la activación de caspasas y activación de MAP kinasas. (Rios *et al.*, 2015).

2.4.7.1 MAP kinasas

Las MAP quinasas (MAPK por sus siglas en inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*), consisten en un grupo de proteínas quinasas de serina o treonina que fosforilan sustratos para la regulación de la expresión génica, mitosis, proliferación, motilidad, metabolismo y programación de muerte celular (Chang & Karin, 2001). La vía de las MAPK resulta de la activación de receptores de tirosina sobre la superficie celular mediante estímulos mitogénicos como factores de crecimiento y citoquinas, que desencadenan su propia activación (figura 4). La vía de las MAPK se encuentra activa en al menos el 30% de las neoplasias humanas y se han identificado mutaciones en Ras, Braf y RTKs; las mutaciones en Ras se asocia con carcinoma de páncreas (63-90%), colon (36-50%), pulmón (19-30%) y melanoma (15-20%) (Baraja 2009; Prior *et al.*, 2012; Luke *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2016).

En diferentes estudios se ha evaluado el efecto que presenta la BEA en diferentes proteínas kinasas relacionadas con la proliferación celular, angiogénesis, supervivencia celular y metástasis, encontrándose que inhibe de forma selectiva la fosforilación de algunas de ellas (Wätjen *et al.*, 2014).

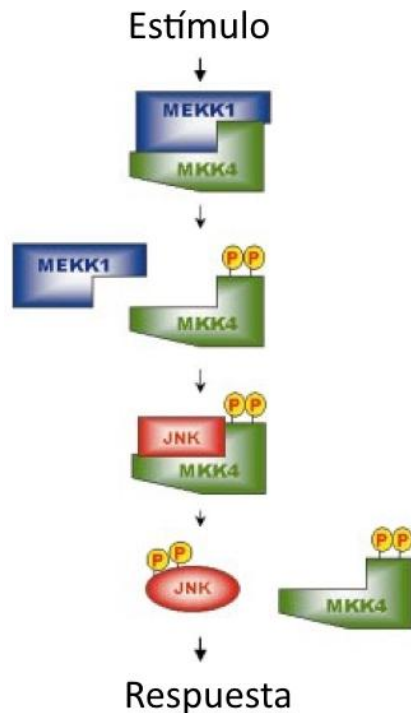


Figura 4. Interacción específica y secuencial entre los miembros de una cascada de MAPK para generar una respuesta. Donde MEKK1 interactúa con MKK4 inactiva para formar un complejo MEKK1-MKK4. MEKK1 fosforila y activa a MKK4 lo que origina una disociación del complejo. MKK4 libre y activa lleva a cabo interacciones específicas con JNK. Una vez que JNK es activada, el complejo MKK4-JNK se disocia y JNK activada va cuesta abajo dentro del núcleo para llevar a cabo el efecto. Modificada de Chang & Karin, 2001.

2.4.7.2 Capacidad ionófora de la beauvericina

La beauvericina presenta propiedades ionóforas como muchos de los antibióticos que también poseen la estructura de un hexadepsipéptido cíclico. Los ionóforos transfieren iones específicos a través de la membrana celular, utilizando transportadores o canales, dependiendo de su selectividad. Esto conduce a una alteración del contenido iónico y por ende de las funciones celulares produciéndose un efecto citotóxico que induce a la apoptosis (Benz, 1978; Kouri *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que las propiedades ionóforas de la beauvericina afectan el balance iónico y el pH fisiológico en una gran variedad de células, inhibiendo el metabolismo celular mediante la despolarización de la membrana mitocondrial y la citólisis (Kouri *et al.*, 2005). Este tipo de mecanismo que utiliza la beauvericina es semejante al utilizado por muchos agentes desacoplantes mitocondriales como valinomicina y carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, por sus siglas

en inglés) los cuales interrumpen la cadena transportadora de electrones incrementando el consumo de oxígeno y produciendo isquemia celular e hipoxia (Prince *et al.*, 1974).

2.4.7.3 Proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas: Familia Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son aquellas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen una clave en la vía intrínseca de la apoptosis celular mediante su interacción con receptores de muerte celular en la mitocondria liberando el citocromo C (Adams & Cory, 1998). Las proteínas Bcl-2 comprende familias homólogas, la familia proapoptótica conformada por Bad, Bak y Bax las cuales inducen la apoptosis y la familia antiapoptótica conformada por Bcl-2 Y Bcl-XL las cuales inhiben la apoptosis (McDonnell *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2005).

La actividad citotóxica que presenta la beauvericina se relaciona con estas dianas biológicas. Se ha reportado la regulación de la familia Bcl-2 en células de cáncer pulmonar de células no pequeñas tratadas con beauvericina, resultando en una disminución de la expresión de Bcl-2 y no afectando la expresión de Bad y Bak (Lin *et al.*, 2005).

2.4.7.4 Cambios en el potencial de membrana mitocondrial

La BEA permite la formación de canales selectivos de cationes (Kouri *et al.*, 2003; Kouri *et al.*, 2005). La beauvericina, al ser una molécula ionófora también tiene la capacidad de formar poros en la membrana celular los cuales se han observado son selectivos, y se ha propuesto un modelo que explica la formación de estos poros por parte de la beauvericina, este modelo sugiere la formación de complejos de beauvericina tipo “*Sandwich*”, es decir, moléculas de beauvericina apiladas de forma vertical, las cuales facilitan así su entrada a la bicapa lipídica de la membrana celular y el acceso de iones desde cualquier extremo del poro que se va formando por dichos complejos, permitiendo así la difusión de un gradiente electroquímico (Ivanov *et al.*, 1973; Kouri *et al.*, 2003; Kouri *et al.*, 2005;). La formación de los poros en la bicapa lipídica afecta el potencial de membrana mitocondrial específicamente por el incremento de Ca^{2+} lo que desencadena la liberación de citocromo C y la activación

de caspasas, que culminan finalmente en la apoptosis celular (Lin *et al.*, 2005; Kouri *et al.*, 2005; Wang & Xu, 2012).

2.5 Fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido es un medio de cultivo caracterizado por su bajo costo energético asociado a una alta productividad de compuestos bioactivos donde los microorganismos como hongos y bacterias invaden materiales sólidos insoluble en agua los cuales varían su nivel de humedad desde un 30 a un 80% (Ruiz-Leza *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2013), utilizado recientemente para la producción de compuestos bioactivos utilizando como sustratos gran variedad de desechos agroindustriales, especialmente de metabolitos secundarios ya que su producción en un ambiente natural es muy bajo.

En los últimos años ha sido una atractiva alternativa frente a la fermentación líquida o sumergida ya que la fermentación en estado sólido provee al microorganismo de tres fases para su desarrollo; una fase líquida, una sólida y una gaseosa que se asemejan al ambiente natural del microorganismo y contribuye a la producción de componentes activos como metabolitos secundarios (Hölker *et al.*, 2003; Singhanía *et al.*, 2008).

2.5.1 Producción de compuestos bioactivos por fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido (FES) ha demostrado ser un exitoso proceso de producción de compuestos bioactivos por ejemplo Robinson & Nigam, (2001) y Singhanía *et al.*, (2009) muestran gran cantidad de metabolitos secundarios y enzimas que han sido producidos por diferentes microorganismos en diferentes estudios utilizando FES como es el caso de Farinas (2015), Gonçalves *et al.*, (2016), Oliveira *et al.*, (2016) y Pérez-Sánchez *et al.*, (2017), que producen metabolitos y enzimas de interés industrial, de igual manera Longo & Sanromán, (2006) muestra la gran variedad de sabores y compuestos aromáticos obtenidos de diferentes microorganismos, también se han producido antibióticos (Tabaraie *et al.*, 2012; Nagavalli *et al.*, 2015), etanol (Yu *et al.*, 2008), entre otros como: pigmentos, aminoácidos, ácidos orgánicos, surfactantes, alcaloides, factores de crecimiento,

biopesticidas, antimicóticos, compuestos fenólicos (Yazid *et al.*, 2017; Sadh *et al.*, 2018).

Los compuestos producidos muchas veces están asociados a la fase estacionaria del crecimiento del microorganismo por lo que en varios casos solamente se producen cuando este se encuentra desarrollándose en su hospedero o hábitat natural por lo que la FES representa un área de oportunidades para la producción biotecnológica industrial de compuestos bioactivos los cuales son difícilmente producibles en medios de cultivo habituales, además cuando los microorganismos crecen en una FES son capaces de expresar genes que solo se expresan infectando a su hospedero natural o en un modelo de infección *in vivo* (Mayorga-Reyes *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015).

2.5.2 Ventajas de la fermentación en estado sólido

La fermentación en estado sólido ofrece una serie de ventajas frente a los procesos convencionales de fermentación sumergida o líquida los cuales son comúnmente utilizados para la producción de compuestos además de que ha demostrado ser un exitoso proceso para la alta productividad de compuestos bioactivos y presenta una serie de ventajas frente a la fermentación sumergida o líquida ya que esta última requiere un enorme gasto energético y de agua, extraer los productos de la fermentación y mantener en funcionamiento los biorreactores donde se llevan a cabo (Singhania *et al.*, 2009; Tabaraie *et al.*, 2012; Farinas, 2015).

La FES a diferencia de la fermentación sumergida o líquida que utiliza sustratos comerciales de valor agregado la FES utiliza residuos agroindustriales que se pueden adquirir fácilmente además se ha encontrado que la fermentación en estado sólido supera considerablemente a la fermentación sumergida o líquida en cuanto a la cantidad de biocompuestos producidos (Abdeljalil *et al.*, 2014; Gonçalves *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Pérez-Sánchez *et al.*, 2017).

Por otra parte la FES al llevarse a cabo en un compartimento cerrado y no necesitar de un afluente de agua además que la baja cantidad de agua libre en el medio brinda al hongo un hábitat similar al natural lo que promueve la producción de metabolitos que el cultivo líquido no se producen o se producen con un bajo rendimiento está

marcada diferencia en la producción de compuestos bioactivos se le ha atribuido a que el contacto del microorganismo con las fase gaseosa, líquida y sólida y con los nutrientes disponibles es diferente entre la fermentación en estado sólido y la fermentación sumergida o líquida. La FES al llevarse a cabo en biorreactores pequeños y cerrados facilita el escalamiento a nivel industrial, aunque se ha observado una buena producción de algunos metabolitos en fermentación líquida o sumergida la FES la supera en costo y beneficio (Robinson & Nigam, 2001; Graminha *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2011; Jain *et al.*, 2013; Behera & Ray, 2016).

2.5.3 Caparazón de camarón

Se trata del exoesqueleto del camarón y al igual que el exoesqueleto de los artrópodos está compuesto principalmente de cadenas de quitina y otros sustituyentes como carbonato cálcico y proteínas tales como: esclerotina, artropodina y resilina las cuales en conjunto son denominadas escleroproteínas y otorgan rigidez al exoesqueleto, las principales diferencias en los exoesqueletos de los artrópodos son las variaciones en estructura y cantidad de resilina, presencia de pigmentos y cantidad de carbonato cálcico, este último se encuentra en más cantidad en los crustáceos que en los insectos (Vincent & Wegst, 2004; Heredia *et al.*, 2007; Michels *et al.*, 2016).

3. HIPÓTESIS

Los niveles de expresión del gen de la beauvericina sintetasa de *Beauveria bassiana* son inducidos por el caparazón de camarón en un cultivo sólido y está relacionado con el tiempo de fermentación.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar el gen perteneciente a la beauvericina sintetasa en *Beauveria bassiana* (*bbBeas*) y evaluar sus niveles de expresión inducidos por el caparazón de camarón a diferentes tiempos de cultivo sólido.

4.2 Objetivos particulares

1. Identificar molecularmente a los HE mediante la amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y de las secuencias ITS.
2. Identificar y amplificar el gen de la beauvericina sintetasa en *Beauveria bassiana*.
3. Evaluar los niveles de expresión del gen de la beauvericina sintetasa en *Beauveria bassiana* (*bbBeas*) en diferentes condiciones de cultivo mediante la medición de la densitometría de banda.
4. Purificar la beauvericina a partir de los extractos de fermentación sólida.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Microorganismo

Los cultivos monoespóricos de 4 cepas de *B. bassiana* (11 y 12 originarias del cepario de biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco y UAMI y UAMII del cepario de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa), una cepa de *I. javanica*, una cepa de *I. Fumosorosea* (Ija e Ifu respectivamente ambas originarias del cepario de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa), una de *M. anisopliae* y otra de *M. robertsii* (MCua y MXoc respectivamente ambas originarias del cepario de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa), fueron activadas en agar dextrosa-papa (Difco[®]), recolectadas en una solución al 30% de glicerol y conservadas a -70°C con el fin de garantizar su viabilidad.

5.1.1 Obtención de cultivos monoespóricos

Para la obtención de cultivos monoespóricos de las cepas utilizadas se realizaron diluciones de los conidios de cada una de ellas y se hicieron crecer en un medio dextrosa-papa a 25 ° C durante 15 días, en cajas Petri. Transcurridos los 15 días de crecimiento se tomó con ayuda de una pipeta Pasteur previamente esterilizada una colonia aislada de una de las cajas Petri la cual fue resembrada en un matraz erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de agar dextrosa papa a 25°C durante 15 días, pasados esos 15 días las esporas fueron recolectadas con 50 mL de una solución de Tween 80 al 0.05% (v/v) en un frasco estéril y resembradas cada 3 meses usando como medio de mantenimiento agar dextrosa-papa.

5.1.2 Viabilidad

Para el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de las cepas de HE se sembraron 300 conidios de cada una de ellas en agar dextrosa-papa (Difco[®]) y dejándolas crecer durante 10 días a 25°C, la viabilidad fue expresada como porcentaje de sobrevivencia relacionando las UFC contadas en la caja después del tiempo de cultivo y el número de conidios sembrados los cuales fueron contados utilizando una cámara de Neubauer.

5.2 Condiciones del cultivo sólido

Los cultivos en estado sólido contenían 500 g de materia húmeda, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$, $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl , $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$, $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{FeSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$, $0.028 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{ZnSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$, $0.032 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{MnSO}_4 - \text{H}_2\text{O}$, $6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarosa, $165.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de bagazo de caña (soporte sólido) y para la inducción de la producción de metabolitos y enzimas se utilizó caparazón de camarón ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). El cultivo en estado sólido contenía una humedad del 75% P/V, un pH de 5.0 y 2×10^6 conidios monoespóricos por gramo de materia húmeda, el cultivo se dejó crecer durante 12 días a 25°C . Las sales fueron añadidas y disueltas en el agua junto con el caparazón de camarón a esta solución se le ajustó el pH y fue esterilizada al igual que el bagazo de caña, la solución se dejó enfriar posteriormente se le inocularon los conidios monoespóricos y se mezcló perfectamente en un matraz erlenmeyer con el bagazo de caña en condiciones estériles (Barranco-Flórido *et al.*, 2002).

5.2.1 Tratamiento del caparazón

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

5.3 Identificación molecular.

5.3.1 Extracción de ADN

Se hizo crecer cada uno de los cultivos monoespóricos de HE (Ija, Ifu, MXoc, Mcua, 11, 12, UAMI y UAMII) en seis cajas Petri para cada cepa en agar dextrosa papa a 25°C durante 15 días de cada uno de los cultivos monoespóricos, al terminar el tiempo de crecimiento el micelio de las cajas fue tomado para la extracción de ADN la cual se llevó a cabo en un área aséptica previamente desinfectada con una solución

de etanol al 70% y todo el material utilizado fue previamente esterilizado con el fin de eliminar DNAsas. El micelio fue colocado en un mortero de porcelana con ayuda de una espátula de metal y a éste fue agregado nitrógeno líquido para congelar el micelio y poder lisar las células con ayuda de un pistilo, inmediatamente después de consumirse el nitrógeno fueron transferidos rápidamente aproximadamente 100 mg del pulverizado a un microtubo de 1.5 mL, este fue cerrado después de que todas las trazas de nitrógeno se consumieran y puesto en un recipiente con nitrógeno manteniéndolo éste último tapado ya que se puede generar mucha presión dentro de los microtubos y pueden abrirse.

Posteriormente, se utilizó el kit comercial DNeasy Plant mini Kit (QIAGEN®) primero se agregaron rápidamente 400 µL del buffer de lisis (AP1) procurando que este toque rápidamente todo el pulverizado de cada microtubo posteriormente los microtubos fueron puestos en un baño María a 65°C durante 10 min moviéndolos suavemente cada 3 minutos. El contenido del tubo se pasó cuidadosamente dentro de la columna morada (DNeasy Mini spin) y ésta se centrifugó por 2 min a 14000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf®), posteriormente la membrana de la columna fue desechada y se tomó el filtrado procurando no tomar el pellet formado al fondo del tubo y fue transferido a un nuevo microtubo al cual se le agregaron 1.5 volúmenes del buffer AW1, fue homogeneizado por pipeteo suave y transferido a la columna blanca (DNeasy Mini spin) y la cual se centrifugó 1 min a 8000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf®). Finalmente la membrana de la columna fue transferida a un nuevo microtubo al cual se le agregaron 40 µL de agua libre de nucleasas luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó 1 min a 8000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf®) este último paso se repitió una vez más, el ADN fue conservado en refrigeración entre 4 y 8°C.

El análisis de la calidad y la cuantificación del ADN fueron llevados a cabo en un Nanodrop (Thermo scientific®), mientras que la integridad del ADN fue analizada observando la presencia de barrido en la banda de ADN con una electroforesis de gel de agarosa al 1% corrida a 80 volts durante 30 minutos en una cámara de electroforesis (BIO-RAD®).

5.3.2 Amplificación de las regiones ribosomales e ITS

Para amplificar las regiones ITS1 y ITS2 así como el gen ribosomal 5.8 se utilizaron los oligonucleótidos universales (IDT[®]) TS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') y ITS5 (5' -GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G- 3') (White *et al.*, 1990) adquiridos de Fermelo Biotec (IDT[®]) mediante la técnica de PCR realizando 6 reacciones con un volumen de reacción de 50 µL cada una contenía 20 ng del ADN molde, 20 µmol de cada oligonucleótido, 2 mM de una mezcla de dNTP's, 5 µL de buffer de *Taq* a una concentración de 10X con 20 mM de MgCl₂ incluido (Thermo scientific[®]), una unidad de *Taq* polimerasa (Thermo scientific[®]) y con lo que basta para 50 µL de agua libre de nucleasas.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MAXIGENE II (AXIGEN[®]) con las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C seguida de 31 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 57°C y 45 segundos de elongación a 72°C finalmente un ciclo de elongación final de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con RedGel[®] y corrido a 100 volts durante 20 min en una cámara de electroforesis (BIO-RAD[®]), fueron visualizados utilizando un transiluminador de luz UV (ULTRA VIOLET PRODUCTS).

5.3.2.1 Purificación de los productos de PCR

Para la purificación del producto de PCR, seis reacciones de PCR de 50 µL cada una fueron homogeneizadas y corridas en un gel de agarosa al 1.5% en un pozo de 3 cm de largo por 0.4 cm de ancho resultado de unir 8 pozos del peine de la cámara de electroforesis con cinta adhesiva, se corrió a 80 volts durante 45 minutos. La banda del gel de agarosa fue recortada con una navaja teniendo cuidado de recuperar la mínima cantidad de agarosa, la banda recortada fue purificada con el kit comercial kit QIAquick PCR Purification gel Kit[®], agregando tres volúmenes de buffer QG respecto al peso de la banda recortada y fue puesto a 50°C en un baño maría durante 10 min con la finalidad de disolver la banda posteriormente el contenido fue transferido la columna QIAquick la cual se centrifugó a 8000 rpm en una microcentrífuga (eppendorf[®]) y el sobrenadante fue desechado a después se lavó la columna

agregando 750 μ L de buffer PE y centrifugándola a 8000rpm en una microcentrífuga finalmente el ADN se recolectó dejando reposar la columna con 60 μ L de agua libre de nucleasas y centrifugando la columna una vez más a 8000rpm en una microcentrífuga en un nuevo microtubo de 1.5 mL.

5.3.2.2 Secuenciación

Los fragmentos amplificados y purificados fueron enviados a secuenciar en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por el método de dideoxiterminación y cada secuencia fue comparada con la base de datos GenBank, para ello los archivos .ab1 fueron abiertos con el programa Chromas y seleccionando en este la opción BLAST. Las secuencias fueron analizadas tomando en consideración los valores la descripción, cobertura e identidad de las secuencias del GenBank más homologas a las obtenidas.

5.4 Análisis bioinformático

5.4.1 Amplificación parcial del gen *bbBeas*

Los oligonucleótidos para la amplificación del gen *bbBeas* fueron diseñados a partir de alineamientos de secuencias de ADN y ARNm del gen de la beauvericina sintetasa en diferentes especies de hongos productores de beauvericina para encontrar las secuencias conservadas en todas las secuencias. Las secuencias utilizadas fueron: ARNm del gen beauvericina sintetasa de la especie *Fusarium venenatum* (código de acceso GenBank: JX975482.1), ADN del gen de la beauvericina sintetasa de la especie *Beauveria bassiana* clon BbBVRC (código de acceso GenBank: HQ141932.1), ADN del gen de la beauvericina sintetasa de la especie *Beauveria bassiana* aislado Bb0062 (código de acceso GenBank: JQ617289.1) y con ARNm del gen de la beauvericina sintetasa de la especie *Beauveria bassiana* aislado ARSEF 2860 (código de acceso del GenBank: XM_008604824.1).

Las secuencias fueron descargadas desde el portal del GenBank en formato FASTA y cargadas a la plataforma en línea *Biology Workbench* creando una cuenta y seleccionando la opción Nucleic Tools y Add new nucleic, posteriormente se

seleccionaron todas las secuencias cargadas y se realizó un alineamiento múltiple seleccionando la opción CLUSTALW Multiple sequence Alignment, finalmente se localizaron las regiones conservadas en todas las secuencias cargadas y se diseñaron los oligonucleótidos teniendo en consideración el tamaño y temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos así como el tamaño del fragmento a amplificar.

5.4.2 Construcción del árbol filogenético y alineamiento de aminoácidos

Fueron descargadas secuencias en formato fasta de la base de datos del GenBank pertenecientes a diferentes secuencias de péptido sintetasa de diversas especies de hongos éstas fueron agrupadas en un solo archivo fasta junto con las secuencias previamente obtenidas del gen *bbBeas* de las cepas UAMI y UAMII, posteriormente todas las secuencias fueron recortadas eliminando los extremos no alineados de todas las secuencias utilizando el programa MEGA 6, una vez recortadas fueron sometidas a un análisis en la plataforma en línea Bellerophon (<http://comp-bio.anu.edu.au/bellerophon/bellerophon.pl>) con el fin de descartar la probabilidad de haber creado quimeras en las secuencias al momento de la edición de éstas. Finalmente para generar el árbol filogenético fue utilizando el programa MEGA 6 y el método estadístico de reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud; evaluando la robustez de los nodos con 1000 repeticiones de bootstrap; y con un modelo de sustitución de nucleótidos de Jukes-Cantor.

La traducción a aminoácidos de las secuencias con mayor homología a las secuencias de las cepas UAMI y UAMII fueron descargadas en formato fasta de la base de datos del GenBank, recortadas y alineadas utilizando el programa MEGA 6 con el fin de buscar secuencias conservadas en la beauvericina sintetasa.

5.5 Amplificación y secuenciación del gen *bbBeas*

La amplificación del gen *bbBeas* se utilizaron los oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias conservadas Beau_synFW (Forward) 5'-ATT-GGA-TGA-TGG-CTA-CAC-CG-3' y Beau_syn2 (Reverse) 5'- CTT-TCC-GGT-GGC-AGT-GCG-3' (IDT®) mediante la técnica de PCR realizando 6 reacciones con un volumen de reacción de 50 µL cada una que contenían 20ng del ADN molde, 20 µmol de cada oligonucleótido,

2mM de una mezcla de dNTP's, 5 μ L de buffer de *Taq* a una concentración de 10X con 20 mM de MgCl₂ incluido (Thermo scientific[®]), una unidad de *Taq* polimerasa (Thermo scientific[®]) y cbp 50 μ L de agua libre de nucleasas. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MAXIGENE II (AXIGEN[®]) con las siguientes condiciones termales: una desnaturalización inicial de 10 minutos a 94°C seguida de 31 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamientos a 60°C y 45 segundos de elongación a 72°C finalmente, un ciclo de elongación final de 7 minutos a 72°C. Los productos de amplificación fueron visualizados como se describe previamente.

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados como se describe anteriormente, finalmente cada secuencia fue comparada con la base de datos GenBank utilizando la herramienta BLAST.

5.6 Extracción y purificación del RNA total

La extracción de ARN total se realizó por triplicado para cada uno de los 3 diferentes tiempos de cultivo (6, 9 y 12 días), todo el material utilizado fue nuevo y libre de nucleasas mientras que los solventes utilizados fueron grado biología molecular, se tomó una muestra de aproximadamente un gramo de fermentación y fue puesto en un mortero con nitrógeno líquido y pulverizado con ayuda de un pistilo y parte de este pulverizado (aproximadamente 150 mg) fue transferido a un microtubo de 1.5 mL y este fue puesto rápidamente en un recipiente con nitrógeno líquido.

El RNA se extrajo utilizando TRIzol[®] primero se añadió a la muestra un mL de TRIzol[®] se homogenizó y centrifugó en una centrífuga GS-15R[®] (BECKMAN) refrigerada a 4°C a 12000 rpm durante 10 min, posteriormente se dejaron reposar a temperatura ambiente 5 min, pasados los 5 min la fase del sobrenadante fue tomada cuidadosamente y transferida a un nuevo microtubo de 1.5 mL el cual contenía 200 μ L de cloroformo y se agitó vigorosamente durante 15 segundos después se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 min, al termino de los 10 minutos se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 15 min a 4°C, enseguida fueron tomados cuidadosamente y la fase superior fue transferida a un nuevo microtubo de 1.5 mL que contenía 500 μ L de isopropanol y se dejó reposar durante 10 min a temperatura

ambiente, pasados los 10 min se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4°C posteriormente se tiro el sobrenadante.

El botón de ARN formado fue lavado con etanol al 75% agregando 1 mL de éste, se homogenizó suavemente con pipeteo y se centrifugó 10 min a 7500 rpm durante 5 min a 4°C, finalmente el ARN se dejó secar durante 10 min a temperatura ambiente y éste fue suspendido en 50 µL de agua tratada con Dietil Pirocarbonato (DEPC).

La concentración de RNA total de todas las muestras fue determinada en un Nanodrop® (Thermo scientific) y su integridad fue analizada mediante electroforesis de gel de agarosa al 1% utilizando buffer TAE 1X preparado con agua DEPC posteriormente el gel fue teñido con RedGel® y visualizados en un transiluminador de luz UV (ULTRA VIOLET PRODUCTS).

5.7 RT-PCR

Los niveles de expresión del gen *bbBeas* fueron evaluados mediante RT-PCR, tomando como control el RNA ribosomal 18S; se utilizó el kit comercial Qiagen One Step RT-PCR kit®. El volumen de reacción fue de 50 µL y cada reacción contenía 0.5 µg de RNA total, 20 µmol del oligonucleótido Beau_synFW, 20 µmol del oligonucleótido Beau_syn2, 2mM de una mezcla de dNTP's, 10 µL de RT-PCR 5X buffer, 10 µL de solución Q 5X y 2 µL de enzima para el gen *bbBeas*, mientras que para el control ribosomal 18S fueron utilizados los oligonucleótidos 18S RNAr L 5'-CCA-TCC-AAT-CGG-TAG-TAG-CG-3' Y 18S RNAr R 5'-GTA-ACC-CGT-TGA-ACC-CAT-T-3'.

Tanto para el control positivo como para el gen *bbBeas* se utilizaron las siguientes condiciones: 30 min a 50°C para la transcripción reversa, 15 min a 95°C para la activación inicial, seguida de 40 ciclos de 1 min de desnaturalización a 94°C, 30 s de alineamiento a 55°C , 1 min de extensión a 72°C. Después de la amplificación los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5% teñidos con RedGel® y visualizados en un transiluminador de luz UV. Las reacciones de RT-PCR para el gen *bbBeas* y los controles ribosomales se realizaron por triplicado.

5.8 Cuantificación por densitometría

Para cuantificar la expresión del gen *bbBeas* fue necesario separar por electroforesis –en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio durante 20 minutos- los productos obtenidos por RT-PCR (inyectando 3µL de cada uno), para después ser visualizados con luz UV en un transiluminador; se utilizó el fotodocumentador Kodak Digital Science 1D 3.6 para obtener las imágenes correspondientes y analizarlas por densitometría, utilizando como parámetros el área de cada banda (píxeles) y la intensidad asignada por el software (unidades arbitrarias); los valores obtenidos de intensidad y área fueron multiplicados entre sí para cada una de las bandas, tomando como referente de concentración el valor obtenido a partir de la banda de 800 pb del marcador de tamaño molecular de Axygen® (M-ADN-100BP, Cat. PID0173430) (Mayorga-Reyes *et al.*, 2012). Se realizó un ANOVA de los valores de concentración obtenidos, por triplicado, para cada ADNc.

5.9 Purificación de la beauvericina

5.9.1 Obtención del extracto de fermentación

Para la obtención del extracto total de la fermentación se pesó la materia húmeda del matraz y se transfirió a un vaso de precipitado de 1 L al cual posteriormente se le agregó 1:1 de agua destilada y fue homogenizado durante 5 min con agitación utilizando un vara de vidrio. Finalmente se obtuvo el extracto total líquido de la fermentación por filtración y compresión directa de la materia de la fermentación.

5.9.2 Semipurificación de los metabolitos secundarios de *B. bassiana*

Los productos de la fermentación sólida fueron centrifugados en una centrífuga refrigerada (Sorvall® RC-5B) durante 10 minutos a 10000 rpm a 4°C, posteriormente se eliminó el precipitado. El sobrenadante se filtró a través de membranas (Whatman®) primero con un diámetro de membrana de 0.7 µm y posteriormente con un diámetro de membrana de 0.45 µm utilizando un equipo de filtrado de vacío (Millipore®), para eliminar las proteínas mayores a 10,000 kDa del sobrenadante filtrado éste se centrifugó nuevamente en tubos Centricon (BioRad®, Irlanda) en una

centrífuga (BECKAMN[®] GPR Centrifuge) durante 20 minutos a 3000 rpm, la fase inferior perteneciente a los metabolitos fue tomada y liofilizada.

Se tomaron 390 mg del liofilizado -correspondientes a un cultivo en estado sólido de 500 gramos- y se suspendieron en 5 mL de buffer de fosfatos 50mM pH=8.0 y se hicieron pasar por una columna de tamiz molecular (Bio-Gel[®] P-6) de 50 cm la cual fue preparada agregando 16 gramos de Bio-Gel[®] P-6 suspendidos en 350 mL de etanol al 30% a una columna de vidrio de 50 cm de largo por 1 cm de ancho utilizando una bomba peristáltica con un flujo continuo de 3.25 min por mL. Los metabolitos se eluyeron utilizando el mismo buffer de fosfatos donde fueron resuspendidos y se obtuvieron 18 fracciones de 6 mL cada una con un flujo constante 19.5 min por fracción. Las fracciones obtenidas fueron analizadas con un barrido UV en un rango de 190 a 400 nm en un espectrofotómetro UV-VIS. Lambda 35 (PerkinElmer[®]).

Las fracciones 4,5, 6, 14 y 15 presentaron una absorbancia alrededor de los 205nm (longitud de onda donde absorbe la BEA) por lo que cada una de ellas fue sometida a una extracción líquido-líquido con 10 mL de hexano el cual fue colocado en otro tubo de ensayo y evaporado utilizando corriente de nitrógeno finalmente fueron reconstituidas con 200 µL de fase móvil y 10 µL de cada una de estas fue inyectado en el cromatógrafo 1260 infinity (Agilent Technologies[®]) con la finalidad de observar la presencia de BEA comparando su espectro y tiempo de retención con los del estándar de BEA. Sin embargo, solamente las fracciones 4, 5 y 6 tuvieron picos con un tiempo de retención y espectro similar al del estándar de BEA por lo que las fracciones 14 y 15 fueron descartadas.

Se obtuvieron nuevamente las fracciones 4, 5 y 6 de la columna de tamiz molecular y fueron homogenizadas entre sí, esta vez se les realizó una extracción en fase sólida primero haciéndolas pasar por un cartucho C18 al cual después se le realizó un lavado de éste con 10 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH=7 posteriormente se eluyeron de éste 5 fracciones de 4 mL cada una con acetonitrilo al 100% las cuales fueron transferidas a tubos de ensayo y llevadas a baño maría para eliminar el acetonitrilo finalmente fueron reconstituidas con 200 µL de fase móvil e inyectadas en

el cromatógrafo 1260 infinity (Agilent Technologies®) con detector de arreglo de diodos.

5.9.4 Análisis cromatográfico

Las 5 fracciones fueron analizadas por HPLC en un cromatógrafo 1260 infinity (Agilent Technologies®) con detector de arreglo de diodos, utilizando una columna C18 de alta eficiencia (Macherey-Nagel® Alemania Ref: 760079.46) con una fase móvil isocrática de metanol 45%, acetonitrilo 45% y acetato de amonio 10mM 10%, antes de realizar la corrida cromatográfica se purgaron las mangueras de los contenedores de los constituyentes de la fase móvil. El método cromatográfico consistió en un flujo de 1mL/min de fase móvil, una temperatura de columna de 40°C y se inyectaron 10µL tanto del estándar de BEA (Sigma®) como de las muestras.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Extracción de ADN

El ADN extraído de las diferentes cepas de HE presentó concentraciones de entre los 10 hasta los 43.4 ng·µL⁻¹ lo que indica que se obtuvieron concentraciones adecuadas de ADN para llevar a cabo la técnica de PCR, en todas las extracciones realizadas se obtuvieron valores entre 1.79 y 2 para la relación 260/280 nm (tabla 1), mientras que para la relación 260/230 nm se obtuvieron valores entre 1.8 y 2.2 (tabla 1) lo que indica que el ADN posee una buena pureza ya que estos valores son indicativos de bajas concentraciones de proteínas y carbohidratos respectivamente, los cuales son contaminantes comunes del ADN provenientes de restos celulares (Tapia-Tussell *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2016;). Por otro lado la extracción de ADN con el kit de extracción DNeasy Plant mini Kit (QIAGEN®) fue apropiada ya que el ADN de todas las cepas presenta integridad (figura 5) lo que indica también que el método de lisis celular físico de congelación con nitrógeno líquido fue el adecuado tal como lo indica Van *et al.*, (1998) donde se concluye que la pulverización de la muestra utilizando nitrógeno líquido, mortero y pistilo se encuentra entre las mejores tres maneras de romper las células obteniendo un ADN integro.

Tabla1. Pureza y concentración del ADN obtenido de las cepas de HE.

Cepa	Relación 260/280	Relación 260/230	Concentración de ADN (ng/ μ L)
<i>B. bassiana</i> cepa11	1.86	2.1	22
<i>B. bassiana</i> cepa 12	1.88	2.22	60
<i>B. bassiana</i> cepa UAMI	2	2	23
<i>B. bassiana</i> cepa UAMII	1.95	2.2	10
<i>M. robertsii</i> cepa MXoc	1.9	2.19	15.5
<i>M. anisopliae</i> cepa MCua	2	2	12.4
<i>I. javanica</i> cepa Ija	1.85	2.11	20.1
<i>I. javanica</i> cepa Ifu	1.79	2.07	43.4

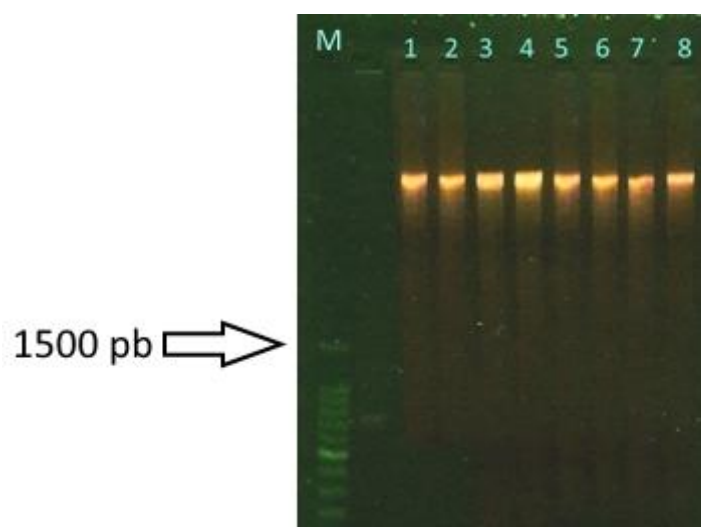


Figura 5. Gel de agarosa al 1% mostrando la integridad del ADN de las cepas de HE. M. Marcador de PM 1: Cepa 11 2: Cepa 12. 3: Cepa UAMI. 4: Cepa UAMII. 5: Cepa MXoc. 6: Cepa MCua. 7: Cepa Ija. 8: Cepa Ifu.

6.2 Viabilidad

La viabilidad de las diferentes cepas de HE utilizados se encuentra entre los 86.2 y 96%, siendo la más alta con 96% de la cepa UAMII de *B. bassiana* y la más baja con 86.2% de la cepa 12 de *B. bassiana*.

Tabla 2. Viabilidad de las cepas de HE

Microorganismo	Cepa	Viabilidad%
<i>B. bassiana</i>	11	94.4
	12	86.2
	UAMI	90.8
	UAMII	96
<i>M. robertsii</i>	MXoc	91.6
<i>M. anisopliae</i>	MCua	91.1
<i>I. Javanica</i>	Ija	89.5
	Ifu	86.5

En la tabla 2 se observa que en todos los casos se obtuvieron rendimientos superiores al 85% lo que indica que se obtuvo una buena viabilidad en todas las cepas e HE utilizadas y los valores se relacionan con Oliveira *et al.*, (2015) quien determina la viabilidad de varias cepas de *B. bassiana* y *Metarhizium anisopliae* en diferentes medios de cultivo y encuentra que la mayor viabilidad obtenida (entre 54.4 y 93.4%) fue utilizando el medio de cultivo PDA el cual también fue utilizado en este estudio. La variabilidad de viabilidad entre cepas de *B. bassiana* puede deberse a la tolerancia entre un aislado y otro en cuanto a diferentes factores externos como: temperatura, disponibilidad de nutrientes, humedad, pH etc. esto es atribuido a su variabilidad genética (Huang & Feng, 2009).

6.3 Identificación molecular

Todos los amplificados tuvieron visiblemente el mismo tamaño en el gel de agarosa (figura 6) ya que todas las cepas se encuentran entre 559 y 603 pb lo cual se relaciona con Yang *et al.*, (2007), que menciona que la longitud del amplificado en todos los casos es cercano a 600 pb.

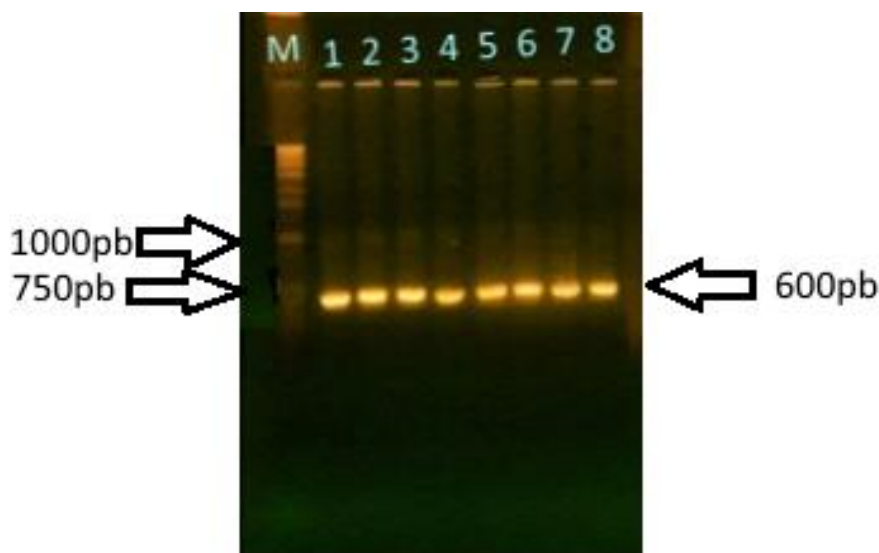


Figura 6. Gel de agarosa al 1% con los productos de PCR de los genes ribosomales y secuencias ITS, de las cepas de HE identificadas molecularmente. M: Marcador, 1: *B. bassiana* cepa UAMI 2: *B. bassiana* cepa UAMII 3: *B. bassiana* cepa 11 4: *B. bassiana* cepa 12 5: *M.* cepa Xoc 6: *M.* cepa Cua 7: *I.* cepa ja 8: *I. javanica* cepa fu.

Para la identificación molecular de las cepas 11, 12, UAMI y UAMII se obtuvieron fragmentos de una longitud de 561, 559, 562 y 568 pb, respectivamente, según la base de datos de GenBank todas las cepas poseen una identidad del 100% a cuatro aislados de *B. bassiana*; aislado NBAII-Bb69, aislado PB Percevejo Bronz SC, aislado F. Carrap y aislado Perc. Bronz. SC (1), a partir de este punto las cepas 11, 12 y UAMII poseen una identidad del 99% con los aislados VKBb03 y 5A mientras que la cepa UAMI posee el mismo grado de homología pero con los aislados voucher FJAT-9719 y 88 (Tablas. 3-6), lo que indica que estas cepas pertenecen a la especie *B. bassiana* y que comparten identidad con varias secuencias del GenBank.

Tabla 3. Identidad de la cepa 11 con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Beauveria bassiana</i> aislado NBAll-Bb69	97	100	gi 380743568 JQ434752.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado PB Percevejo Bronz SC	97	100	gi 364524467 JN195743.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado F. Carrap.	97	100	gi 364524465 JN195741.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado Perc. Bronz. SC (1)	97	100	gi 364524464 JN195740.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado VKBb03	97	99	gi 1321388299 MG548313.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado 5A	97	99	gi 1063188731 KX255641.1

Tabla 4. Identidad de la cepa 12 con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Beauveria bassiana</i> aislado NBAll-Bb69	97	100	gi 380743568 JQ434752.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado PB Percevejo Bronz SC	97	100	gi 364524467 JN195743.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado F. Carrap.	97	100	gi 364524465 JN195741.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado Perc. Bronz. SC (1)	97	100	gi 364524464 JN195740.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado VKBb03	97	99	gi 1321388299 MG548313.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado 5A	97	99	gi 1063188731 KX255641.1

Tabla 5. Identidad de la cepa UAMI con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Beauveria bassiana</i> aislado NBAll-Bb69	96	100	gi 380743568 JQ434752.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado PB Percevejo Bronz SC	96	100	gi 364524467 JN195743.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado F. Carrap.	96	100	gi 364524465 JN195741.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado Perc. Bronz. SC (1)	96	100	gi 364524464 JN195740.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado voucher FJAT-9719	96	99	gi 378556206 JQ320366.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado 88	96	99	gi 298573194 HM189220.1

Tabla 6. Identidad de la cepa UAMII con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Beauveria bassiana</i> aislado NBAll-Bb69	96	100	gi 380743568 JQ434752.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado PB Percevejo Bronz SC	96	100	gi 364524467 JN195743.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado F. Carrap.	96	100	gi 364524465 JN195741.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado Perc. Bronz. SC (1)	96	100	gi 364524464 JN195740.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado VKBb03	96	99	gi 1321388299 MG548313.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado 5A	96	99	gi 1063188731 KX255641.1

La longitud del amplificado de la cepa Ija fue de 586 pb con una identidad del 99% a *I. javanica* cepa RCEF4687 (tabla 7), mientras que la cepa Ifu obtuvo un fragmento de

una longitud de 586 pb con una identidad del 92% con *I. javanica* aislado ACP, sin embargo, también posee una identidad del 92% con *I. fumosorosea* aislado FAFU-2 (tabla 8) esto se le atribuye a que aislados pertenecientes a *I. javanica* y a *I. fumosorosea* muestran una estrecha relación tanto morfológica como genética, ya que Gallou *et al.*, (2016), observó que tanto aislados de *I. javanica* e *I. fumosorosea* pueden ubicarse dentro de un mismo clado evolutivo en varios árboles filogenéticos basados en secuencias ITS, β -tubulina y factor de elongación 1- α las cuales también fueron utilizadas para la identificación molecular, el posicionamiento de *I. javanica* e *I. fumosorosea* en un mismo clado evolutivo utilizando las regiones ITS y el factor de elongación 1- α también algo similar fue observado por D'Alessandro *et al.*, (2014) donde no solo se observa relación entre estas especies si no también con otras del género *Isaria*.

Tabla 7. Identidad de la cepa Ija con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Isaria javanica</i> cepa RCEF4687	96	99	gi 357942720 JN204422.1
<i>Isaria javanica</i> genes para 18S	96	99	gi 116174501 AB277860.1
<i>Paecilomyces javanicus</i> genes para 18S	96	99	gi 109638190 AB263744.1
<i>Isaria javanica</i> aislado voucher CHE-CNRCB 305/1	95	99	gi 806984386 KM234215.1
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> cepa ARSEF 4501	96	99	gi 18448732 AF461747.1
<i>Isaria javanica</i> aislado voucher CHE-CNRCB 305/2	94	99	gi 806984384 KM234213.1

Tabla 8. Identidad de la cepa Ifu con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Isaria javanica</i> aislado ACP	85	92	gi 1334718617 MG837718.1
<i>Isaria fumosorosea</i> aislado FAFU-2	85	92	gi 1334718616 MG837717.1
<i>Isaria fumosorosea</i> aislado FAFU-1	85	92	gi 1334718615 MG837716.1
<i>Isaria javanica</i> cepa BE01	85	92	gi 1333448670 MG825098.1
<i>Isaria javanica</i> cepa NB IFR-19	85	92	gi 1127253875 KX898415.1
<i>Isaria javanica</i> cepa CHE-CNRCB 324	85	92	gi 998454857 KT225593.1

Por otro lado, la cepa MXoc y la cepa MCua tuvieron una longitud de 603 pb y 600 pb respectivamente ambas poseen una identidad del 99% con el aislado FAFU-1 de *M. anisopliae*, también mostraron una identidad con los aislados E377 de *M. robertsii* y KTU-49 de *M. anisopliae*. Sin embargo, para éstos la cepa MCua tuvo una identidad del 100% y la cepa MXoc del 99% con el resto de los aislados son diferentes entre las dos cepas (tablas 9 y 10) en todos los casos se obtuvieron coberturas del 95% o superiores. Ambas cepas comparten secuencias de *M. anisopliae* y de *M. robertsii* con identidades y coberturas altas indica que el método de identificación molecular mediante las secuencias ITS no es adecuado para la identificación molecular de especies cercanas entre sí como es el caso de *M. anisopliae* y de *M. robertsii*.

Los resultados se relacionan con Kepler & Rehner (2013) quienes mencionan que las regiones ITS poseen baja capacidad para diferenciar especies del género *Metarhizium*, por otra parte al igual que *Isaria* las especies de *Metarhizium* se encuentran estrechamente relacionadas morfológica y genéticamente y en algunos árboles filogenéticos aislados de *M. anisopliae* y de *M. robertsii* se encuentran en un mismo clado junto con otros aislados de diferente especies de *Metarhizium* (Kepler &

Rehner, 2013; Kepler *et al.*, 2015) lo cual también podría explicar la alta homología de las cepas MCu y MXoc con las especies *M. anisopliae* y *M. robertsii*.

Tabla 9. Identidad de la cepa MXoc con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Metarhizium robertsii</i> cepa E377	95	99	gi 1233688525 MF681566.1
<i>Metarhizium anisopliae</i> aislado KTU-49	95	99	gi 224482296 FJ177473.1
<i>Metarhizium anisopliae</i> aislado KTU-26	95	99	gi 224482308 FJ177485.1
<i>Metarhizium anisopliae</i> aislado FAFU-1	95	99	gi 1335028323 MG844433.1
<i>Metarhizium</i> spp. cepa E1089	95	99	gi 1233688592 MF681633.1
<i>Metarhizium robertsii</i> cepa E127	95	99	gi 1233688476 MF681517.1

Tabla 10. Identidad de la cepa MCua con base al GenBank

Descripción	Cobertura%	Identidad%	Número de acceso
<i>Metarhizium anisopliae</i> cepa M11	97	99	gi 1328368789 MG786737.1
<i>Metarhizium anisopliae</i> aislado FAFU-1	97	99	gi 1335028323 MG844433.1
<i>Metarhizium anisopliae</i> cepa RZU-10	98	99	gi 695167187 KM117232.1
<i>Metarhizium anisopliae</i> aislado KTU-49	95	100	gi 224482296 FJ177473.1
<i>Metarhizium</i> spp. Aislado E650	97	99	gi 1233688541 MF681582.1
<i>Metarhizium robertsii</i> cepa E377	95	100	gi 1233688525 MF681566.1

Los resultados indican que la identificación molecular mediante la amplificación y secuenciación de los genes ribosomales no es adecuada para la identificación entre subespecies o especies estrechamente relacionadas, Cheng *et al.*, (2014) considera la identificación molecular mediante las secuencias ITS como una herramienta útil para la identificación de especies. Sin embargo, no se le atribuye aplicabilidad para diferenciar especies cercanas entre sí o subespecies, por otro lado Hinrikson *et al.*, (2005) menciona que este método no es adecuado para la diferenciación de subespecies ya éstas poseen regiones dentro de las secuencias ITS las cuales son 91.9 al 99.6% idénticas en las subespecies lo que dificulta su identificación.

Finalmente Jing-Jie *et al.*, (2013) y Wang *et al.*, (2013) mencionan que existen diferencias genéticas en otros sitios del genoma de *B. bassiana* suficientemente importantes para dividir aislados de ésta especie en diferentes clados evolutivos. Lo anterior sugiere el uso de otro método de identificación molecular en conjunto a éste, como lo realizado por A'llesandro *et al.*, 2014 y por Gallou *et al.*, 2016 donde utilizan otras regiones del genoma además de las regiones ITS para identificar molecularmente especies de HE como el gen de la β -tubulina y el factor de elongación 1- α .

6.4 Amplificación parcial del gen *bbBeas*

Con los oligonucleótidos Beau_synFW y Beau_syn2 se logró la amplificación del gen *bbBeas* en las cepas UAMI y UAMII, sin embargo, en las cepas 11, 12, Ija, Ifu, MXoc y MCua no hubo amplificación (figura 7). Las secuencias de las cepas UAMI y UAMII poseen tamaños de 778 y 787 pb respectivamente y que tienen homología con el gen *bbBeas* de *B. bassiana* específicamente con el sitio que codifica para el dominio de adenilación, y con genes responsables de la síntesis de ciclodepsipéptidos en aislados del género *Fusarium* y con la beauvericina sintetasa del aislado ARSEF 2679 de *I. fumosorosea* (Tablas 11 y 12).

Tabla 11 Homología del fragmento amplificado de la cepa UAMI con el gen *bbBeas*

Descripción	Cobertura%	Homología%	Número de acceso
<i>Beauveria bassiana</i> aislado Bb0062 gen BEAS	98	97	gi 386873574 JQ617289.1
<i>Beauveria bassiana</i> clon BbBVRC BEAS gen	98	97	gi 309252532 HQ141932.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado ARSEF 2860 BEAS RNAm	98	96	gi 667662428 XM_008604824.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado ATCC 7159 BEAS gen	98	96	gi 208658288 EU886196.1
<i>Fusarium oxysporum</i> aislado FB1501 ciclopéptido sintetasa gen	97	70	gi 283574792 GU294760.1
<i>Isaria Fumosorosea</i> aislado ARSEF 2679 BEAS ARNm	97	69	gi 1089711464 XM_018843786.1

Tabla 12 Homología del fragmento amplificado de la cepa UAMII con el gen *bbBeas*

Descripción	Cobertura%	Homología%	Número de acceso
<i>Beauveria bassiana</i> aislado Bb0062 gen BEAS	94	96	gi 386873574 JQ617289.1
<i>Beauveria bassiana</i> clon BbBVRC BEAS gen	94	96	gi 309252532 HQ141932.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado ARSEF 2860 BEAS RNAm	94	96	gi 667662428 XM_008604824.1
<i>Beauveria bassiana</i> aislado ATCC 7159 BEAS gen	94	95	gi 208658288 EU886196.1
<i>Fusarium oxysporum</i> f. cucumerinum enniatina sintetasa	73	72	gi 724471665 KP000028.1
<i>Isaria Fumosorosea</i> aislado ARSEF 2679 BEAS ARNm	88	69	gi 1089711464 XM_018843786.1

La ausencia del fragmento amplificado del gen de la beauvericina sintetasa en las cepas del género *Isaria* y *Metarhizium* (figura 7) es atribuido a que en el alineamiento para el diseño de los oligonucleótidos no se utilizaron secuencias pertenecientes a especies de éstos géneros, sin embargo, hubo ausencia de amplificado en las cepas 11 y 12, aunque se traten de *B. bassiana* lo cual puede deberse a variaciones genéticas que se han encontrado en aislados de *B. bassiana* (Jing-Jie *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

Ha sido reportado (Liuzzi *et al.*, 2017) que las péptido sintetasas no ribosomales de hongos poseen al menos tres dominios uno de ellos es el dominio de adenilación encargado de reconocer los aminoácidos al momento de llevar a cabo la síntesis de péptidos, el sitio catalítico de dichos dominios es altamente conservado por lo que la variación genética a la que se le atribuye la ausencia de amplificado en las cepas 11 y 12 no se encontraría en el sitio catalítico de adenilación, pero sí en un sitio aledaño a éste el cual podría ser el sitio de unión de los oligonucleótidos. Esto sugiere el diseño de unos nuevos oligonucleótidos realizando un nuevo alineamiento con más secuencias del gen *bbBeas* o tomar los sitios catalíticos para su diseño, con el fin de evitar la ausencia de amplificado en algunas cepas de *B. bassiana*.

Diferentes autores (Rehner & Bukley, 2005; Wang *et al.*, 2013) han analizado los procesos evolutivos de *B. bassiana* y han relacionado la variabilidad de patogenicidad y virulencia entre aislados de *B. bassiana* a cambios en el genoma llevados a cabo por procesos evolutivos posiblemente en genes que codifican para enzimas productoras de metabolitos secundarios como es el caso del gen *bbBeas*. Dichas variaciones genéticas en éste gen no tendrían lugar en los sitios catalíticos de adenilación ya que estos son altamente conservados pero sí en otras zonas dentro del dominio de adenilación que pueden variar de una especie o subespecie a otra (Liuzzi *et al.*, 2017).

Las variaciones genéticas podrían evitar la unión de los oligonucleótidos utilizados y como consecuencia la ausencia de amplificado, por otra parte también podrían comprometer la producción de BEA tal como lo reporta Luangsa *et al.*, (2009) donde encuentra que el gen responsable de la síntesis de beauvericina en cepas del género *Isaria* está en una zona del genoma denominada *hotspot* es decir una parte del

genoma altamente propensa a mutar y a presentar altos niveles de recombinación genética, en el mismo estudio se presentan cepas de *B. bassiana* que no producen beauvericina en las condiciones que utilizan por lo que es de esperarse que de igual manera el gen *bbBeas* se encuentre en una *hotspot* comprometiendo la producción de beauvericina, Valencia *et al.*, (2011) también encuentra marcadas diferencias en la producción de BEA entre cepas de *B. bassiana* aisladas de diferentes lugares, éstas mutaciones y recombinaciones en el gen *bbBeas* resaltan la importancia de la selección de cepas para la producción de BEA.

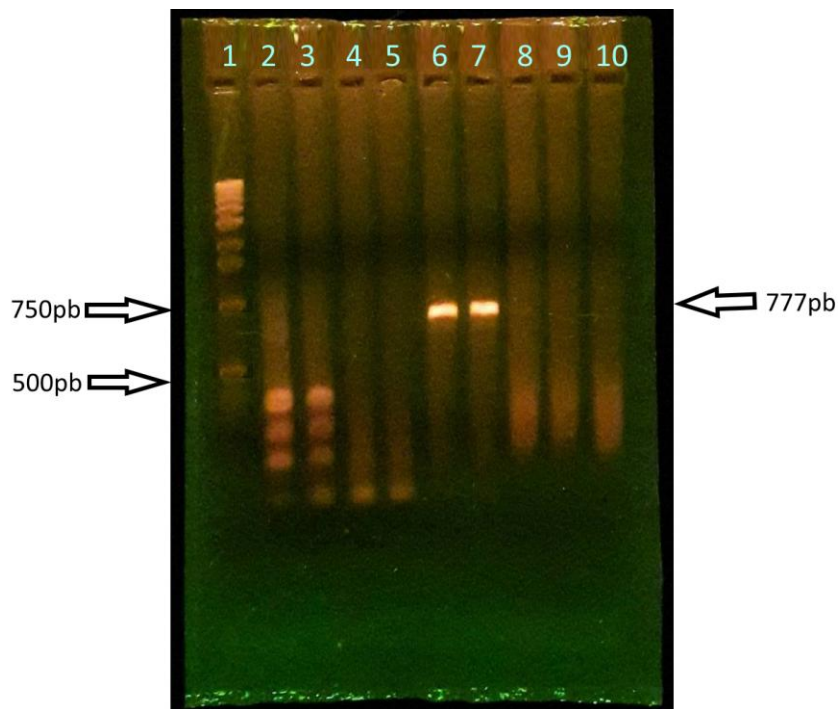


Figura 7. Gel de agarosa al 1% donde se visualizan los productos de PCR de la amplificación parcial del gen *bbBeas* para las cepas UAMI y UAMII, la amplificación inespecífica para las cepas de *Isaria* y la ausencia de amplificado para el resto de las cepas. 1: Marcador, 2: *I. javanica* cepa Ija, 3: *I. javanica* cepa Ifu, 4: *M. robertsii* cepa MXoc 5: *M. anisopliae* cepa Cua 6: *B. bassiana* cepa UAM I, 7: *B. bassiana* Cepa UAMII, 8: *B. bassiana* Cepa 11, 9: *B. bassiana* cepa 12. 10: Control negativo.

Las secuencias obtenidas con los oligonucleótidos diseñados mostraron una homología con el gen *bbBeas* (tablas 11y 12) de *B. bassiana* aislado Bb0062 y *B. bassiana* clon BbBVRC de 97% la cepa UAMI y de 96% la cepa UAMII, con *B. bassiana* aislado ARSEF 2860 ambas cepas 96% y con *B. bassiana* cepa ATCC 7159 la cepa UAMI 96% y la cepa UAMII 95%, con coberturas del 97 y 98% para la cepa UAMI y 94% para la cepa UAMII. Por otro lado también mostraron una homología con el gen de la beauvericina sintetasa de *I. fumosorosea* aislado ARSEF 2679 de 69%

para ambas cepas pero con una cobertura del 97% para la cepa UAMI y de 88% para la cepa UAMII.

Aunque ambas secuencias mostraron homología con el gen de la beauvericina sintetasa en *I. fumosorosea* no hubo amplificado en las cepas Ija e Ifu que pertenecen al género *Isaria* esto se le atribuye a que la homología es inferior al 70% y aunque las péptido sintetetasas tienen en común la presencia de tres dominios (dominio de adenilación, dominio transportador de aminoácidos y dominio de condensación) (Zhang *et al.*, 2013; Liuzzi *et al.*, 2017) se ha observado que éstos poseen marcadas diferencias de una especie a otra (Jirakkakul *et al.*, 2008).

Debido a la ausencia de amplificado para las cepas 11 y 12 de *B. bassiana*, *Isaria* y *Metarhizium* se hizo una variación de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos Beau_synFW y Beau_syn2 empleando un gradiente de temperatura con la finalidad de confirmar la ausencia de amplificado del gen de la beauvericina sintetasa en las cepas de *Isaria* y *Metarhizium*. Es sabido que la variación en la temperatura de alineamiento posee un papel importante en la unión de los oligonucleótidos ya que si la temperatura de alineamiento es muy baja, se obtiene un PCR menos específico, ya que los oligonucleótidos no se comportan de una manera exigente al momento de unirse a sus sitios complementarios por el contrario si la temperatura es muy alta la especificidad será mayor y requerirá de un 100% de complementariedad (Eguiarte *et al.*, 2007).

El gradiente fue realizado usando temperaturas inferiores a la T_m de los oligonucleótidos con el fin de promover la unión de los oligonucleótidos. El gradiente (figura 8) mostró que se obtuvieron bandas de amplificación inespecíficas en las cepas del género *Isaria* y *Metarhizium* las cuales no corresponden al tamaño esperado y pueden estar atribuidas a que los oligonucleótidos son específicos para la especie *B. bassiana*.

La disminución de la temperatura de alineamiento hizo que los oligonucleótidos se unieran a otros sitios del genoma de *Isaria* y *Metarhizium* que no corresponden al gen de la beauvericina sintetasa, por lo que al ir aumentando la temperatura de

alineamiento las bandas inespecíficas se atenúan progresivamente. Sin embargo, pueden corresponder a sitios del genoma de *Isaria* y *Metarhizium* que codifican para dominios de enzimas responsables de la síntesis de destruxinas en el caso de *Metarhizium* y enniatinas en el caso de *Isaria* dichos dominios se han reportado comparten similitud con dominios de la beauvericina sintetasa (Xu *et al.*, 2009; Liuzzi *et al.*, 2017).



Figura 8. Gel de agarosa al 1% con los productos del gradiente de temperatura de alineamiento. 1: Marcador de peso molecular, 2: *I. javanica* (cepa lja) 56°C, 3: *I. javanica* (cepa lfu) 56°C, 4: Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 56°C, 5: *M. robertsii* (cepa MXoc) 56°C, 6: *M. anisopliae* (cepa MCua) 56°C, 7: *I. javanica* (cepa lja) 57°C, 8: *I. javanica* (cepa lfu) 57°C, 9: Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 57°C, 10: *M. robertsii* (cepa MXoc) 57°C, 11: *M. anisopliae* (cepa MCua) 57°C, 12: *I. javanica* (cepa lja) 58°C, 13: *I. javanica* (cepa lfu) 58°C, 14: Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 58°C, 15: *M. robertsii* (cepa MXoc) 58°C, 16: *M. anisopliae* (cepa MCua) 58°C, 17: *I. javanica* (cepa lja) 59°C, 18: *I. javanica* (cepa lfu) 59°C, 19: Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 59°C, 20: *M. robertsii* (cepa MXoc) 59°C, 21: *M. anisopliae* (cepa MCua) 59, 22: *I. javanica* (cepa lja) 60°C, 23: *I. javanica* (cepa lfu) 60°C, 24: Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 60°C, 25: *M. robertsii* (cepa MXoc) 60°C, 26: *M. anisopliae* (cepa MCua) 60°C.

También se realizó un gradiente en la temperatura de alineamiento para las cepas 11 y 12 de *B. bassiana* (figura 9) esperando que al disminuir la T_m hubiera una amplificación del gen *bbBeas*. Sin embargo, no se obtuvo ninguna banda lo cual apoya la presencia de la ya mencionada variabilidad genética entre aislados de *B. bassiana* especialmente en el dominio de adenilación.

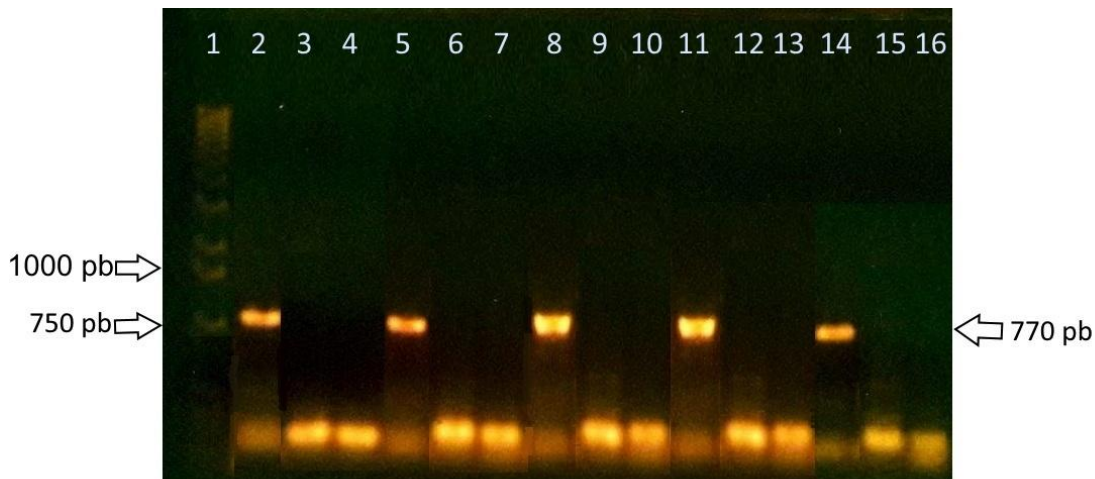


Figura 9. Gel de agarosa al 1% donde se muestran los productos de PCR obtenidos con el gradiente de temperatura de alineamiento 1: Marcador de peso molecular, 2: Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 56°C, 3: *B. bassiana* cepa 11 56°C, 4: *B. bassiana* cepa 12 56°C, 5: Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 57°C, 6: *B. bassiana* cepa 11 57°C, 7: *B. bassiana* cepa 12 57°C, 8: Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 58°C, 9: *B. bassiana* cepa 11 58°C, 10: *B. bassiana* cepa 12 58°C, 11. Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 59°C. 12: *B. bassiana* cepa 11 59°C, 13 *B. bassiana* cepa 12 59°C, 14: Control positivo (*B. bassiana* cepa UAMI) 60°C, 15: *B. bassiana* cepa 11 60°C. 16: *B. bassiana* cepa 12 60°C.

6.4.1 Traducción de los amplificadores del gen *bbBeas*

En *B. bassiana* la síntesis de BEA se lleva a cabo mediante un proceso llamado síntesis no ribosomal en el cual existe unión de aminoácidos fuera de un ribosoma y es llevado a cabo por enzimas multifuncionales, es decir enzimas con diferentes sitios catalíticos con distintas funciones implicadas en la síntesis de péptidos (Zobel *et al.*, 2016; Süssmuth & Mainz, 2017). Estas enzimas multifuncionales contienen al menos tres dominios presentes en su estructura un dominio de adenilación el cual lleva acabo el reconocimiento de aminoácidos, un dominio peptidil transportador encargado de transportar las unidades intermediarias de la síntesis y un dominio de condensación que cataliza la unión de aminoácidos y la formación de la estructura final, dichos dominios poseen sitios catalíticos altamente conservados (Zhang *et al.*, 2013; Liuzzi *et al.*, 2017).

Los fragmentos amplificados del gen *bbBeas* codifican para el “dominio de adenilación” y tienen una homología con las enzimas beauvericina sintetasa y enniatina sintetasa. El alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos (figura 10), indicó que las secuencias obtenidas de las cepas UAMI y UAMII poseen

alta homología con estas enzimas: la cepa UAMI 96% y la cepa UAMII 92% con la enniatina sintetasa de *B. bassiana* D1-5 (KGQ11754.1); 96% (UAMI) y 91% (UAMII) con la beauvericina sintetasa de *B. bassiana* (AFJ44691.1); 95% (UAMI) y 90% (UAMII) con la beauvericina sintetasa ARSEF 2860 (XP_008603046.1); 73% (UAMI) y 69% (UAMII) con la enniatina sintetasa de *Hirsutella minnesotensis* 3608 (KJZ71937.1); 69% (UAMI) y 65% (UAMII) con la beauvericina sintetasa de *I. fomesorosea* ARSEF 2679 (XP_018708236.1), así como 70% (UAMI) y 66% (UAMII) con la enniatina sintetasa de *Fusarium oxysporum* (EXL90988.1).

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos (figura 10), muestra que las secuencias del gen *bbBeas* obtenidas de las cepas UAMI y UAMII poseen tres regiones importantes que también están presentes en otras beauvericina sintetetas y enniatinas sintetetas de diferentes especies de hongos.

La primera de éstas regiones está semiconservada en las ocho secuencias utilizadas ya que tres (XP_018708236.1, KJZ71937.1 y EXL90988.1) de de las secuencias utilizadas difieren específicamente en los aminoácidos con posiciones: 4, 10 y 13 respecto a ésta región semiconservada la cual comprende de quince aminoácidos, la segunda y tercera región importantes en el dominio de adenilación poseen doce aminoácidos cada una los cuales están conservados en las ocho secuencias utilizadas, dentro de estas tres secuencias se encuentran sitios importantes en el dominio de adenilación previamente descritos por Jirakkakul *et al.*, (2008), en una bassianolido sintetasa en la especie *Xylaria spp.*

El primero de éstos sitios tiene quince aminoácidos (GELVIESPGIARGYI) y está ubicado en la primera región (semiconservada) indicada en el alineamiento, el segundo comprende de seis aminoácidos (YRTGDL) ubicado en la segunda región conservada indicada en el alineamiento y el tercer sitio con once aminoácidos (DSQVKIRGQRV) ubicado en la tercera región conservada indicada en el alineamiento.

La presencia de regiones conservadas en el alineamiento y su homología con los sitios reportados por Jirakkakul *et al.*, (2008), indican la presencia de sitios conservados en las enzimas beauvericina sintetasa, enniatina sintetasa y bassianolido sintetasa de diferentes especies de hongos como: *B. bassiana*,

Fusarium oxysporum, *I. fumosorosea*, *Hirsutella minnesotensis* y *Xylaria spp.* específicamente en el dominio de adenilación, la homología entre éstas enzimas en diferentes sitios ya ha sido reportada por varios autores (Zhang *et al.*, 2013; Zobel *et al.*, 2016; Liuzzi *et al.*, 2017).

Lo anterior sugiere que estas regiones podrían tratarse de sitios catalíticos conservados en todas estas especies ya que tanto la beauvericina, las enniatinas y los bassianolidos poseen una estructura similar por tratarse de depsipéptidos cíclicos y ser sintetizados por enzimas multifunciones es decir por enzimas con varios sitios catalíticos. Sin embargo, el alineamiento de aminoácidos (figura 10) también muestra diferencias importantes en las secuencias con las que se realizó debido a las inserciones y deleciones que ocurren en los sitios *hotspot* provocando cambios conformacionales en la enzima previamente descritos por Liuzzi *et al.*, (2017) los cuales pueden explicar la diferencia en la producción de BEA entre una cepa y otra.

			. * . * * : * * . * : * * : * * * : * * * * : * * . * * . * : * *
UAMI	1	VHPDDPDR LAPVGAV	GELLIESPGIARGYIAAPATDRNP
UAMII	1	VHPDDPDR LAPVGAV	GELLIESPGIARGYIAAPATDRNP
AFJ44691.1	817	VHPDDPDR LAPVGAV	GELLIESPGIARGYIAAPATDRNP
KGQ11754.1	817	VHPDDPER LAPVGAV	GELLIESPGIARGYIAAPATDRNP
XP_008603046.1	743	VHPDDPDR LAPVGAV	GELLIESPGIARGYIAAPATDRNP
XP_018708236.1	813	ADPEDPDR LAPIGAV	GELLIESPGVARGYIAAPAGDAVP
KJZ71937.1	818	IDPNDPNRLVPIGAV	GELVIESPGIARDYIVAPMPDRSP
EXL90988.1	812	IDPSPDNRLVPIGAV	GELVIESPGIARDYIIPPPTEKSP
			* : * * * . . : : * * . * * * * * * * * : * * * : * * * *
UAMI	40	FLETAPAWYAPRQLPAGV	KFYRTGDLARYASDGTVVCLG
UAMII	40	FLETAPAWYAPRQLPAGV	KFYRTGDLARYASDGTVVCLG
AFJ44691.1	857	FLETAPAWYAPRQLPAGV	KFYRTGDLARYAADGTVVCLG
KGQ11754.1	857	FLETAPAWYAPRQLPAGV	KFYRTGDLARYAADGTVVCLG
XP_008603046.1	783	FLETPAWYAPRQLPAGV	KFYRTGDLARYAADGTVVCLG
XP_018708236.1	853	FLEEPPKWAYPREMPRGV	KFYRTGDLARYAADGTVVCLG
KJZ71937.1	858	FFVTAPTWYPSKQLPDGF	KFYRTGDLARYASDGTIVCLG
EXL90988.1	852	FFSTVPAWYPSKQLPNGL	KFYRTGDLARYASDGTVVCLG
			* : * * * * * * * * * : . * * * . : * * * : * * . * : : * . * * * :
UAMI	80	RIDSQVKIRGQRVEMGAVETRLRQQLPSDMTVVAEAVKR	
UAMII	80	RIDSQVKIRGQRVEMGAVETRLRQQLPSDMTVVAEAVKR	
AFJ44691.1	897	RIDSQVKIRGQRVEMGAVETRLRQQLPSDITVVAEAVKR	
KGQ11754.1	897	RIDSQVKIRGQRVEMGAVETRLRQQLPSDITVVAEAVKR	
XP_008603046.1	823	RIDSQVKIRGQRVEMGAVETRLRQQLPSDITVVAEAVKR	
XP_018708236.1	893	RVDSQVKIRGQRVESAVETRLRQHLPGDVTVVAEAVKR	
KJZ71937.1	898	RMDSQVKIRGQRVEMGAVENRLRQQLPDDMAIVVEAVNR	
EXL90988.1	892	RMDSQVKIRGQRVEMGAVETHLRQQLPDDMSIVVEAVKT	
			* . . . * * . : * * * : . : . . * * .
UAMI	120	SDSSGSTVIAAFLIDSSETNNA-----SAASAKDARILD	
UAMII	120	SDSSGSTVIAAFLIDSSETNNA-----SAASAKDARILD	
AFJ44691.1	937	SDSSGSTVITAFLLIDSSDKNNA-----SAASAKDARILD	
KGQ11754.1	937	SDSSGSTAITAFLLIDSSSETNNV-----SAASAKDARILD	
XP_008603046.1	863	SGSSGSTVITAFLLIDSSDKNNS-----SAASAKDARILD	
XP_018708236.1	933	SDAAGSTVITAFLLMSPSMERNGADVKAEGDDAALILG	
KJZ71937.1	938	SDSSSSTVLTAFLIGSSQAAKEN---VNTKSAEDVHILD	
EXL90988.1	932	SDSPTSTVLVAFLIVS-----KGTEAAGDATILD	
			* . : : . * * * * * * * * * : * * * : * * . * * . * *
UAMI	155	QKATQEMNEKLCQVLPPhSVSPSCYICMHALPRATGK	
UAMII	155	QKATQEMNEKLCQVLPPhSVSPSCYICMHALPRTXPK	
AFJ44691.1	972	QTATQEMNAKLCQVLPPhSVSPSCYICMHDLPRATGK	
KGQ11754.1	972	QIATQEMNEKLCQVLPPhSVSPSCYICMHALPRATGK	
XP_008603046.1	898	QTATQEMNAKLCQVLPPhSVSPSCYICMHALPRATGK	
XP_018708236.1	973	RDAVRDVEDDKLRQVLPPhSVPTCYVCMNALPRATGK	
KJZ71937.1	975	QSATKEINAKLEQVLPPhSVSPSCYICMGNLPRATGK	
EXL90988.1	962	LAATKEMSAKLEQVLPPhSIPSCYISMQHILPRATGK	

Figura 10. Alineamientos de las secuencias de aminoácidos de la beauvericina sintetasa y de la enniatina sintetasa de diversos orígenes. UAMI y UAMII, Secuencias obtenidas de las cepas UAMI y UAMII de *B. bassiana*. AFJ44691.1, Beauvericina sintetasa de *B. bassiana*; KGQ11754.1, Enniatina sintetasa de *B. bassiana* D1-5; XP_008603046.1, Beauvericina sintetasa de *B. bassiana* ARSEF 2860; XP_018708236.1, BEAS beauvericina sintetasa de *I. fumosorosea* ARSEF 2679; KJZ71937.1, Enniatina sintetasa de *Hirsutella minnesotensis* 3608; EXL90988.1, Enniatina sintetasa de *Fusarium oxysporum*. Los aminoácidos iguales se muestran con un *. Las secuencias conservadas de aminoácidos mencionadas en el texto están encerradas en cuadros.

6.4.2 Filogenia

El árbol filogenético del gen *bbBeas* y otras péptido sintetetasas (figura 11) muestra que el gen de la beauvericina sintetetasa en *B. bassiana* e *I. fumosorosea* poseen el mismo ancestro en común más reciente, dentro de ese mismo clado se encuentran el resto de péptido sintetetasas de *B. bassiana*, *Fusarium* y *G. intermedia* el otro clado del árbol tenemos a las péptido sintetetasas de *Metarhizium*, *Trichoderma* y *Bipolaris*.

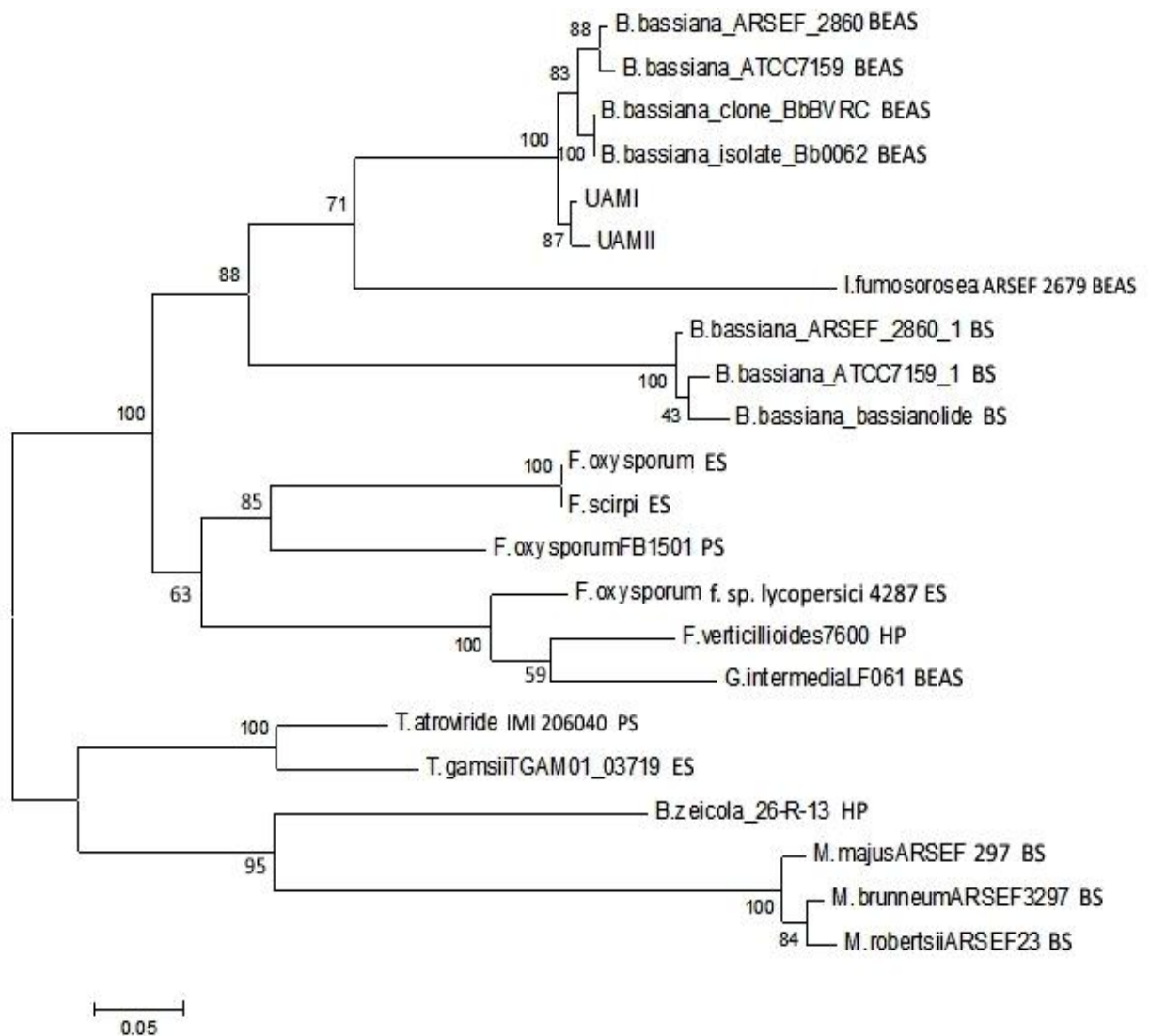


Figura 11. Análisis filogenético de los genes de la beauvericina sintetetasa (BEAS), enniatina sintetetasa (ES), bassianolido sintetetasa (BS), péptido sintetetasa (PS) y otras proteínas hipotéticas (HP) de diferentes orígenes. El método estadístico de reconstrucción filogenética utilizado fue el de máxima verosimilitud; la robustez de los nodos se evaluó con 1000 repeticiones de bootstrap; el modelo de sustitución de nucleótidos fue Jukes-Cantor. Las secuencias de referencia fueron tomadas del GenBank y todas tienen una longitud de 722 pb. La barra representa 5 sustituciones por 100 nucleótidos.

La estrecha relación evolutiva en el gen *bbBeas* con otros genes de observada en la figura 11 hace que algunas de las secuencias utilizadas posean ancestros en común aunque se trate de diferentes enzimas en diferentes especies de hongos, sin embargo, también existe la presencia de clados evolutivos dentro del árbol filogenético lo cual puede deberse a la previamente mencionada gran variabilidad genética en aislados de *B. bassiana* (Fernandes *et al.*, 2006; Estrada *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2009; Ferri *et al.*, 2012) y más específicamente a la variabilidad del gen *bbBeas* (Liuzzi *et al.*, 2017) también descrita anteriormente.

A pesar de éstas variaciones en las diferentes enzimas productoras de péptidos y a la presencia de clados evolutivos en el árbol filogenético, también se ha reportado que este tipo de enzimas encargadas de la síntesis no ribosomal de péptidos además de poseer los dominios de adenilación, peptidil transportador y condensación pueden presentar dominios extras en la enzima según el péptido que sintetizen entre los que resaltan: un segundo dominio de adenilación, dominio de epimerización, dominio de heterociclación, dominio de oxidación, dominio N-metilación, dominio de tiolación entre otros que son activadores de intermediarios en la síntesis de péptidos (Jirakkakul *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2013; Liuzzi *et al.*, 2017). Debido a que las secuencias utilizadas pertenecen al dominio de adenilación el cual contiene regiones conservadas y que está presente en todas las enzimas pueden permitir obtener una relación filogenética entre todas las secuencias utilizadas explicando así la divergencia evolutiva de este gen en diferentes especies.

6.5 Niveles de expresión del gen *bbBeas* en cultivo sólido

Debido a que la fermentación en estado sólido ha demostrado ser un exitoso proceso de producción de compuestos bioactivos de valor agregado a bajo costo y con ventajas frente a otros tipos de cultivo es importante determinar el tiempo de cultivo sólido donde se obtiene la mayor expresión del gen como una medida indirecta de la producción de BEA, por lo cual se realizaron cultivos en estado sólido de *B. bassiana* donde se observó la variación de la expresión del gen *bbBeas* en tres diferentes tiempos de cultivo sólido.

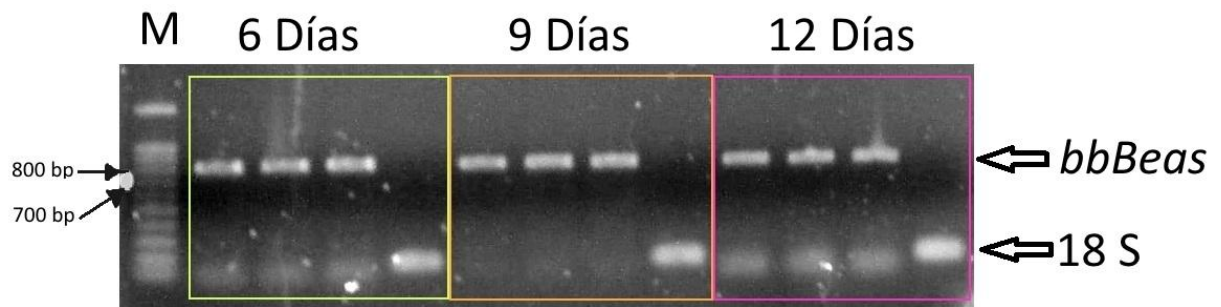


Figura 12. Electroforesis al 1% con los productos de RT-PCR del gen *bbBeas* a diferentes tiempos de cultivo.

En la figura 12 se observa claramente que el gen *bbBeas* se expresa en los 6, 9 y 12 días del cultivo sólido de *B. bassiana* ya que se observan fragmentos de aproximadamente 800 pb en los tres tiempos los cuales corresponden al ADNc generados por expresión del gen la cual es variable en cada tiempo comparándolo con el control ribosomal 18S que permanece constante, sin embargo, la diferencia en la intensidad de las bandas no es visible a simple vista.

Posteriormente se cuantifico la cantidad de ADNc (figura 13) la cuantificación por densitometría se realizó tomando el área de cada banda (píxeles) y la intensidad de éstas para relacionarlas con el área e intensidad del marcador el cual contiene una concentración conocida de ADN y así reportar la expresión en $\text{ng de ADNc} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

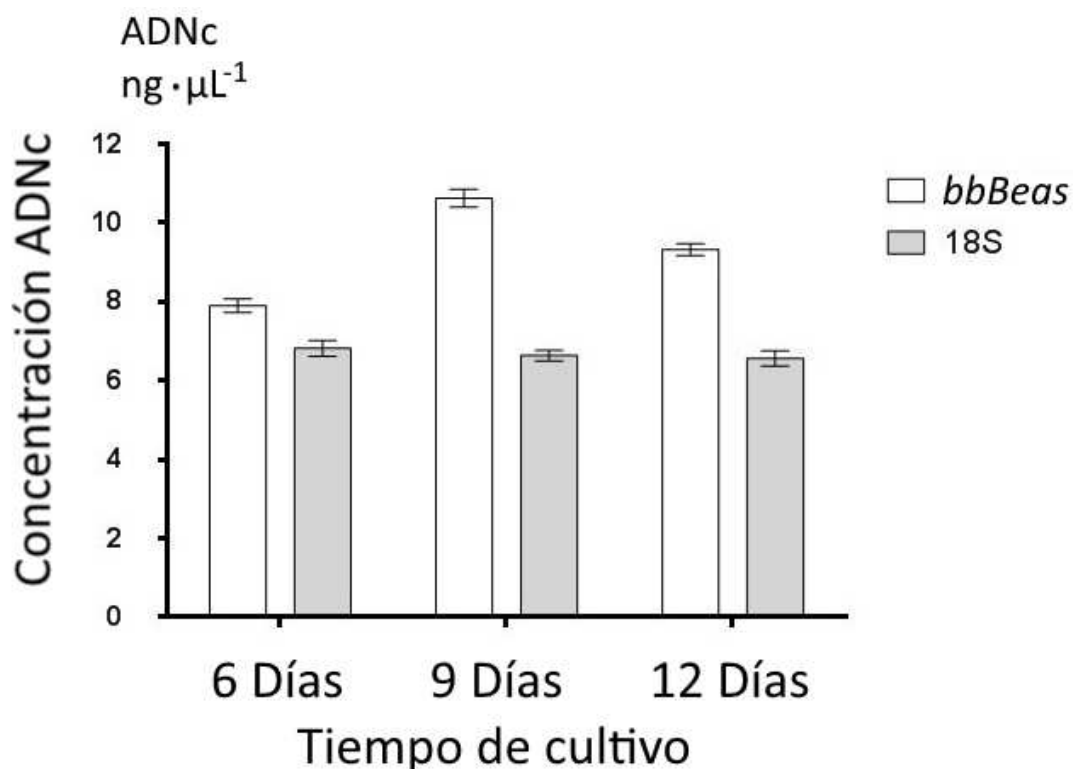


Figura 13. Cuantificación de la expresión del gen *bbBeas* por densitometría, representado en ng de ADNc·μL⁻¹

En la figura 13 se observa que los niveles de expresión del gen varían de acuerdo con el tiempo de cultivo, donde el mayor nivel de expresión fue de 10.62 ng/μL a los 9 días con una diferencia significativa (F:54.26 , P ≤0.0001) respecto a los otros tiempos 6 y 12 días donde los niveles de expresión fueron 25.59 y 12.22 % menores respectivamente, mientras que en los controles ribosomales no hubo una diferencia significativa (F:0.5445 , P=0.6063) entre los tiempos de cultivo.

Los resultados sugieren que los niveles de expresión pueden tomarse como un indicativo de la producción de BEA, ya que estos resultados se relacionan con Jiang *et al.*, (2013) que determina la concentración de BEA en un modelo de infección *in vivo* de *B. bassiana* encontrando que hay una mayor cantidad de BEA a los nueve días de la infección, la baja concentración de BEA que reporta los primeros días de infección se relaciona con Chen *et al.*, (2017) quien muestra que la expresión de los genes implicados en la síntesis de metabolitos secundarios permanece baja los primeros días también en un modelo de infección *in vivo* de *B. bassiana*.

Se ha reportado que la biosíntesis de metabolitos secundarios está regulada por diferentes factores genéticos, epigenéticos y ambientales (Liuzzi *et al.*, 2017) y que la regulación de los genes de *B. bassiana* que participan en el proceso de infección se ha clasificado en cuatro fases según la etapa de la infección es decir que existen cuatro momentos en la infección de *B. bassiana* donde cambia de forma importante la expresión de sus genes, la primera fase es cuando *B. bassiana* penetra la cutícula del insecto, la segunda fase cuando invade la hemolinfa del insecto, la tercera cuando inicia la formación de cuerpo hifales dentro del insecto y la última cuando crece el micelio encima del cuerpo del insecto (Chen *et al.*, 2017; Lai *et al.*, 2017).

La variabilidad de la expresión del gen *bbBeas* en el cultivo sólido y la relación con su expresión en modelos de infección *in vivo* indican que el cultivo en estado sólido simula una infección *in vivo* de *B. bassiana* ya que es capaz de activar la vía de señalización responsable de su expresión la cual según Lai *et al.*, (2017) se trata de un receptor anclado a proteínas G el cual se activa según la etapa de infección en la que se encuentre *B. bassiana* ya que los genes relacionados a los metabolitos se expresan cuando el hongo entra en contacto con la hemolinfa del insecto.

La subunidad alfa de la proteína G anclada al receptor puede activar la adenilato ciclasa la cual incrementa los niveles de AMPc y como consecuencia de esto se inicia la transducción de señales activando la proteína kinasa (PKA) dependiente de AMPc, dando lugar a la expresión del gen *bbBeas*, esto está relacionado con Barranco *et al.*, (2013) ya que menciona que la producción de metabolitos secundarios está regulada por MAPK y con PKA dependiente de AMPc, también se ha encontrado que algunos genes pueden expresarse en dos o hasta en tres etapas de la infección *in vivo* de *B. bassiana* (Lai *et al.*, 2017), por lo que la expresión del gen *bbBeas* puede depender de más de un factor, es posible que el caparazón de camarón presente en el medio de cultivo sólido al tener similitud con la cutícula del insecto sea capaz de llevar a cabo la misma transducción de señales que en los modelos de infección *in vivo* de *B. bassiana* y de esta manera expresar el gen *bbBeas*. Lo anterior da pauta a la investigación sobre la vía o vías de señalización que se activan en el cultivo en

estado sólido con caparazón de camarón que es responsable de la expresión del gen *bbBeas*.

6.6 Purificación de la beauvericina

Debido a que *B. bassiana* produce gran cantidad de metabolitos secundarios con características fisicoquímicas similares a la beauvericina y análogos de ésta (Wang & Xu, 2012; Sivanathan & Scherkenbeck, 2014) resulta de gran importancia llevar a cabo una adecuada purificación de la BEA. La mayoría de los estudios en los que se purifica la BEA lo hacen mediante una extracción líquido-líquido si se trata de un medio de cultivo líquido o líquido-sólido si se trata del cuerpo de un insecto infectado por un HE, utilizando solventes orgánicos como el acetonitrilo o el metanol los cuales posteriormente filtran e inyectan a HPLC preparativo (Logrieco *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2013; Rachmawati *et al.*, 2018). Sin embargo, en otros casos después de la extracción con solventes orgánicos se lleva a cabo una extracción en fase sólida (EFS) con el fin de eliminar contaminantes antes de ser inyectado al cromatógrafo preparativo (Meca *et al.*, 2010), en todos los casos se utiliza un detector de masas o resonancia magnética nuclear para confirmar la presencia de BEA.

Para realizar una purificación más completa a la mayoría de estudios reportados se obtuvo el extracto total del cultivo sólido y se le eliminaron las proteínas mayores a 10,000 kDa para solo obtener los metabolitos, posteriormente éstos fueron pasados por un tamiz molecular para separar las moléculas presentes por orden decreciente al tamaño molecular de éste tamiz molecular se obtuvieron 18 fracciones las cuales fueron analizadas mediante un barrido UV de 200 a 700nm (figura 14).

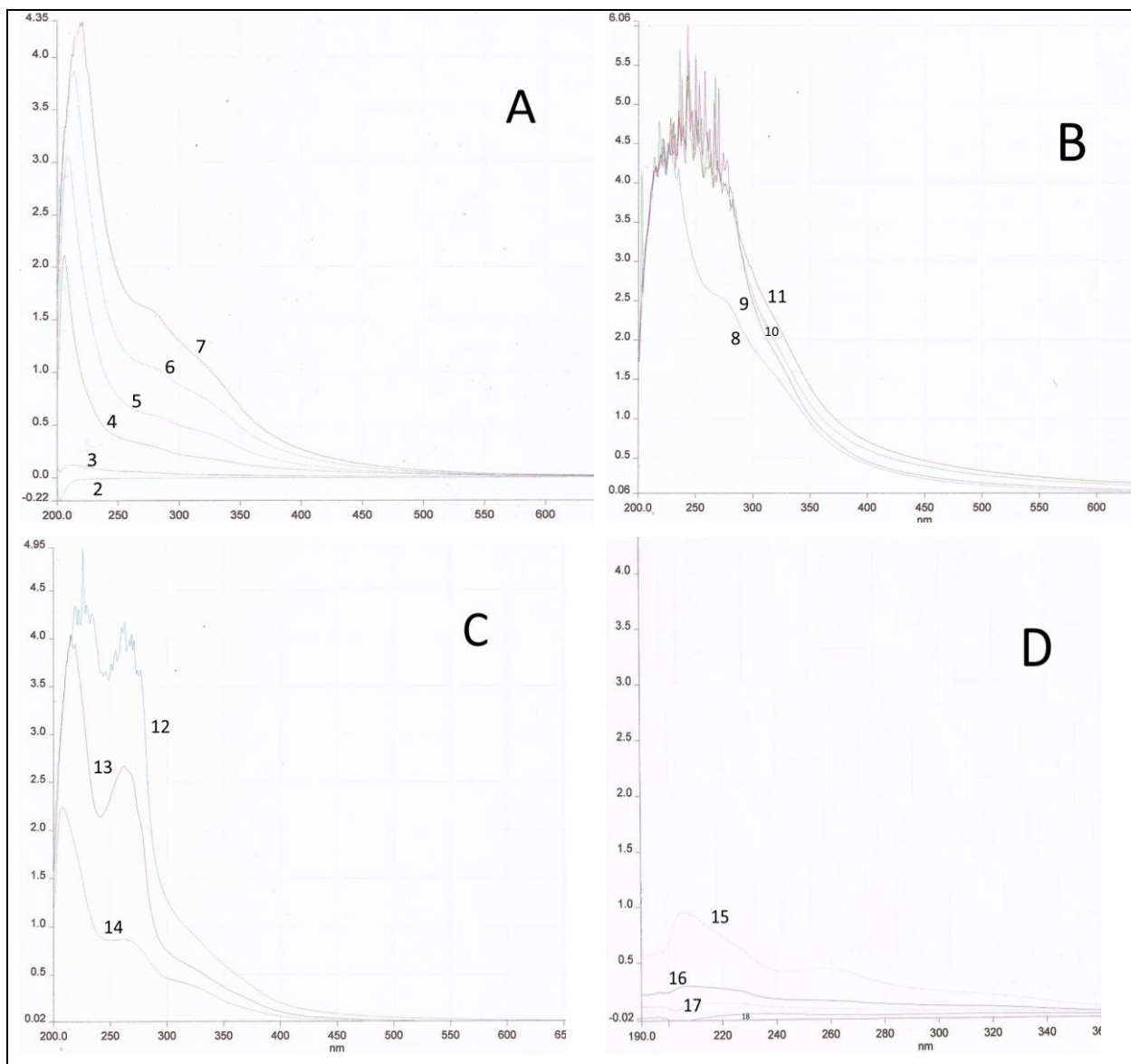


Figura 14. Barrido UV de las obtenidas de la columna de tamiz molecular. A: fracciones 2-7. B: fracciones 8-11. C: fracciones 12-14. D: fracciones 15-18.

De los espectros de absorción de estas fracciones se seleccionaron las fracciones 4, 5, 6, 14 y 15 ya que mostraron poseer una absorción máxima de 205nm en el barrido UV la cual corresponde a la longitud de onda donde se detecta la BEA (Logrieco *et al.*, 2002), éstas fracciones fueron sometidas a una extracción líquido/líquido antes de ser inyectadas al cromatógrafo, los cromatogramas de estas fracciones 4, 5, 6 14 y 15 (figura 15) muestran que todas poseen picos con un tiempo de retención similar al del estándar de BEA (figura 16A). Sin embargo, al analizar los espectros de dichos picos

(anexo 1) se observa que solamente las fracciones 4, 5 y 6 tienen similitud con el espectro del estándar de BEA (figura 16B), por lo que las fracciones 14 y 15 del tamiz molecular fueron descartadas. Debido a que las fracciones 4, 5 y 6 requerían de mayor purificación por la visible presencia de otros componentes que afectan la resolución del pico de interés, se volvieron a obtener nuevamente del tamiz molecular, fueron homogenizadas y al igual que Meca *et al.*, (2010) fueron sometidas a una extracción en fase sólida (EFS) utilizando un cartucho C18 de la cual se obtuvieron 5 fracciones de 4 mL cada una.

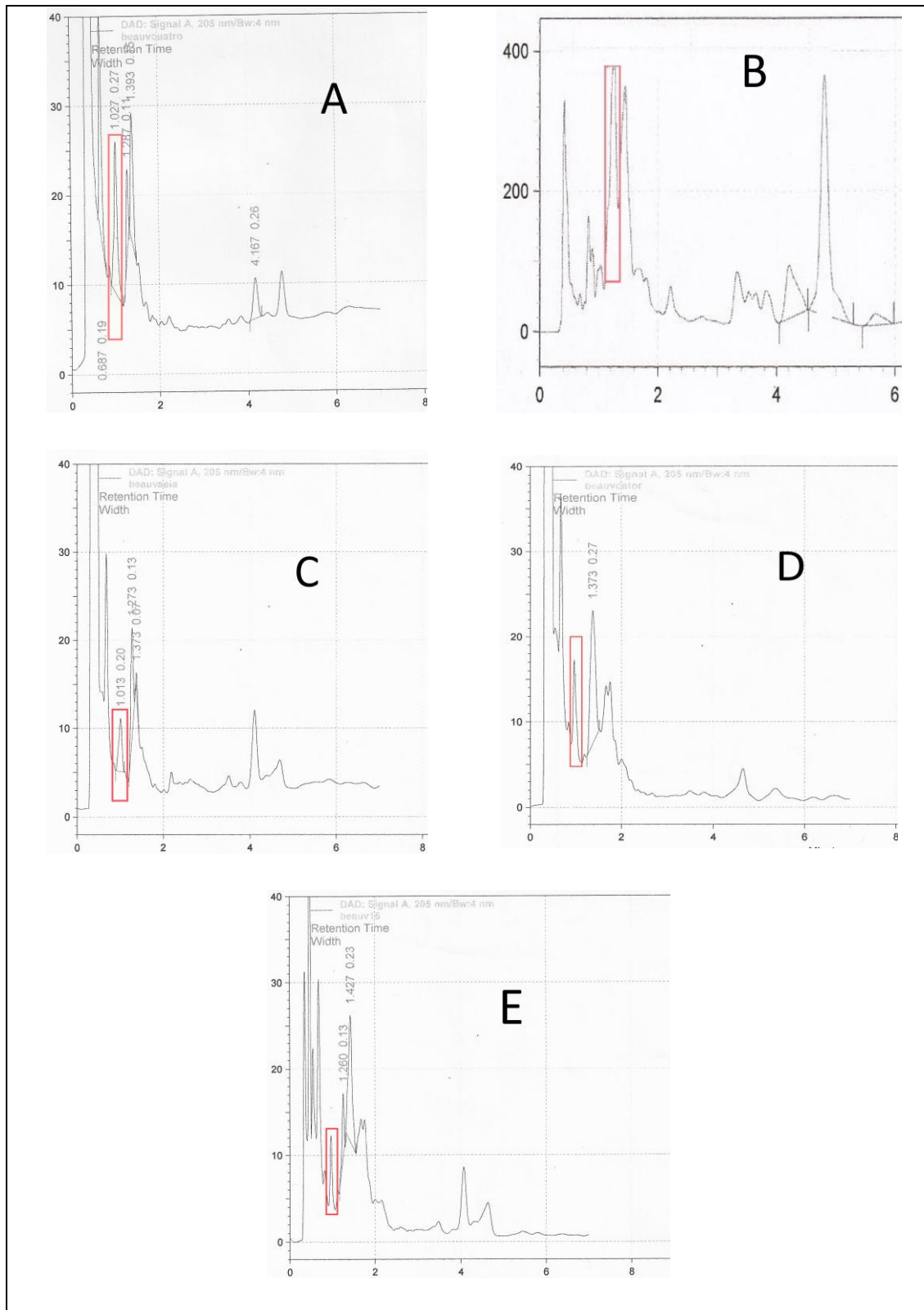


Figura 15. Cromatograma de las fracciones de tamiz molecular indicando el pico más cercano al tiempo de retención de BEA. A: fracción 4. B: fracción 5 C: fracción 6. D: fracción 14. E: fracción 15.

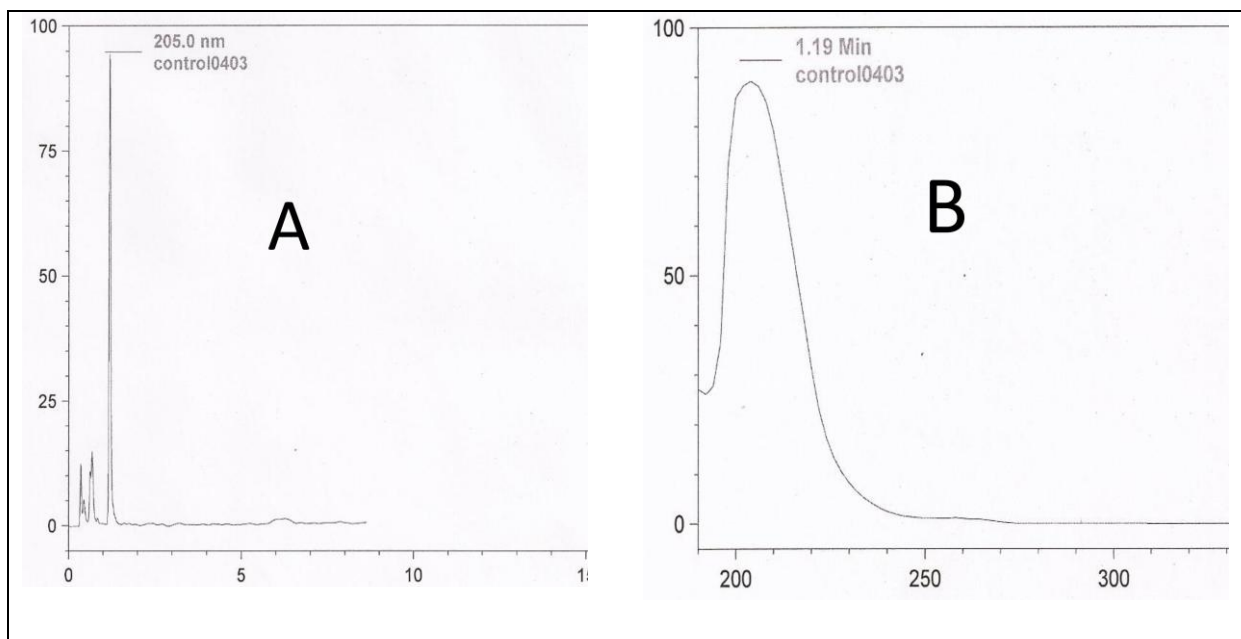


Figura 16. Estándar de BEA. A: cromatograma B: espectro

Los cromatogramas (figura 17) de las cinco fracciones obtenidas de la EFS muestran una notable disminución en los picos inespecíficos por lo que los picos a los que se les atribuye la presencia de BEA poseen una mayor resolución y similitud con el estándar de BEA (figura 16) en cuanto a tiempo de retención, lo que sugiere podría tratarse de BEA, lo cual se relaciona con Logrieco *et al.*, (2002) que identifica BEA en sus muestras mediante una comparación de sus espectros con el espectro del estándar de BEA. Sin embargo, la presencia de BEA en sus muestras fue confirmada mediante HPLC anclado a espectroscopia de masas (MS).

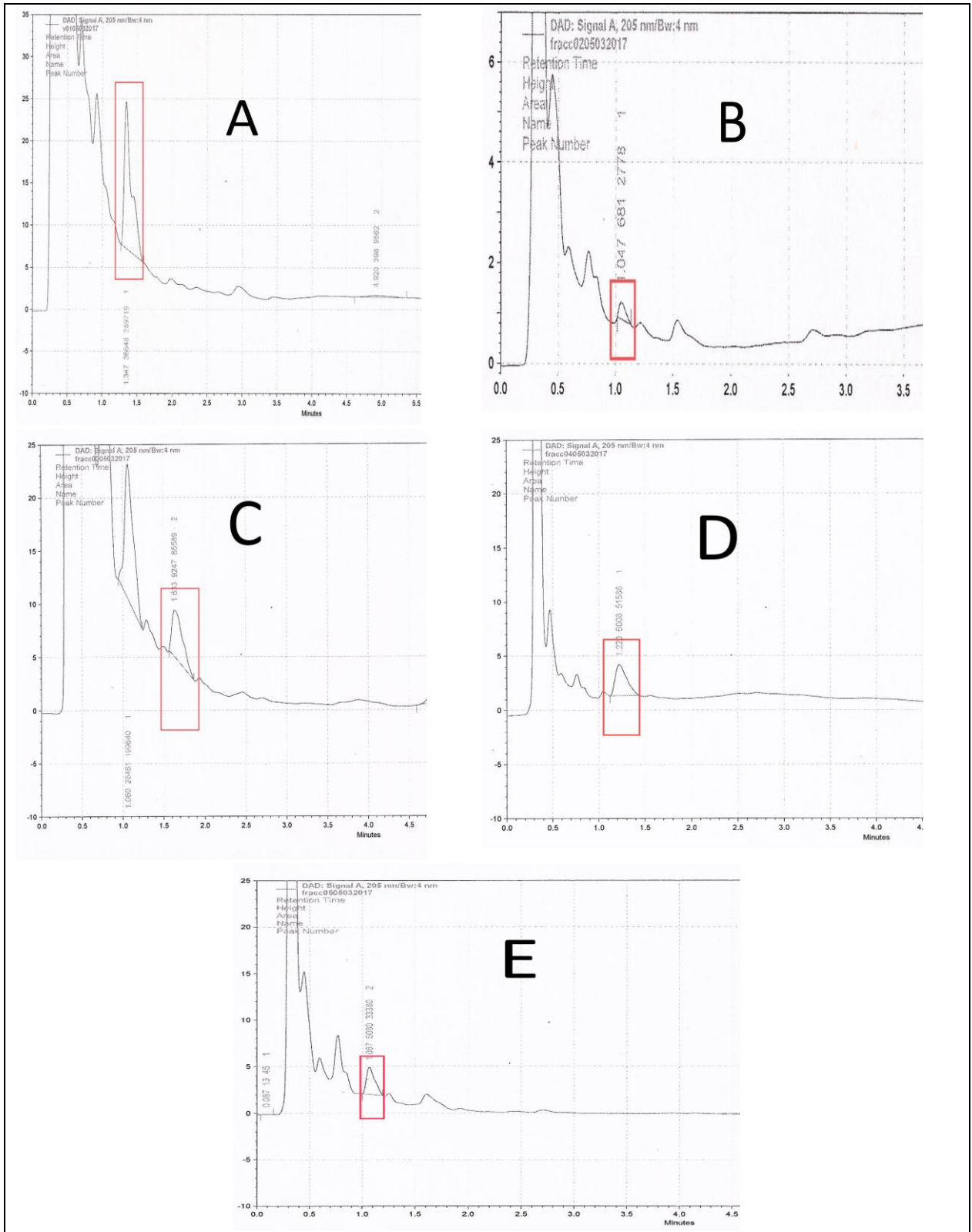


Figura 17. Cromatogramas de las fracciones obtenidas de la EFS con cartucho C18. A: fracción 1. B: fracción 2. C: fracción 3. D: fracción 4. E: fracción 5.

Considerando que el pico presente en todas las fracciones obtenidas con la EFS se trata efectivamente de BEA se realizó una estimación de la concentración de beauvericina para cada una de las fracciones (tabla 13) similar a lo realizado por Logrieco *et al.*, (2002) que cuantifican la cantidad de BEA de las muestras tomando en cuenta el área bajo la curva (ABC) de los espectros UV de sus muestras y el del estándar de BEA.

Tabla 13. Estimación de la concentración de BEA

Fracción de la EFS	ABC del espectro	Concentración estimada de BEA en µg/fracción de 4mL
1	259719	0.024
2	2778	0.00026
3	199640	0.018
4	51588	0.0048
5	33380	0.0031

Estimación de la concentración de BEA en las diferentes fracciones obtenidas de la EFS. Utilizando el ABC del pico del estándar de beauvericina que posee un valor de 723727 el cual equivale a una concentración de 0.017 µg/mL.

Debido a que se inyectó la misma cantidad (10 µL) del control y las muestras la estimación se llevó a cabo realizando una regla de tres utilizando el ABC del espectro del pico al que se le atribuye la presencia de BEA de cada fracción de la EFS y el ABC del espectro del estándar de BEA. La estimación de la concentración de BEA en las diferentes fracciones obtenidas de la EFS indica que las fracciones 1 y 3 poseen la mayor cantidad de BEA pero se puede observar que el espectro de la fracción 4 (figura 17D) presenta una mayor pureza en relación al resto de las fracciones de la EFS. Sin embargo, la concentración de BEA es muy baja en todas las fracciones lo que sugiere utilizar otro método de purificación o utilizar un solvente orgánico como el acetonitrilo para extraer los metabolitos de la fermentación en estado sólido.

7. CONCLUSIONES

1. La identificación molecular mediante la amplificación y secuenciación de los genes ribosomales y secuencias ITS indicó que cuatro de las cepas utilizadas pertenecen a la especie *B. bassiana*, dos a *I. javanica*, una a *M. robertsii* y una a *M. anisopliae*. Sin embargo, se sugiere el uso de otro gen para la identificación de especies estrechamente relacionadas entre sí.
2. Solamente dos de las cuatro cepas identificadas como *B. bassiana* amplificaron la región parcial del gen *bbBeas* correspondiente a una parte del dominio de adenilación, por lo que se propone el diseño de nuevos oligonucleótidos basados en secuencias que codifican para los sitios catalíticos de la enzima BbBEAS.
3. La especie *B. bassiana* expresa el gen *bbBeas* en el cultivo en estado sólido siendo su mayor expresión a los 9 días de cultivo, lo que sugiere que el caparazón de camarón activa la vía de señalización para la producción de BEA.
4. Los fragmentos obtenidos del gen *bbBeas* de las cepas UAMI y UAMII comparten ancestros en común con otras péptido sintetasa así como regiones conservadas importantes en la síntesis de depsipéptidos.
5. La columna de tamiz molecular y la EFS con cartuchos C18 es un método adecuado para la semipurificación de BEA. Sin embargo, se sugiere un mayor proceso de purificación y un mejor método de identificación.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abdeljalil S, Saibi W, Hmad IB, Baklouti A, Mahmoud FB, Belghith H, Gargouri A (2014) Improvement of cellulose and xylanase production by solid-state fermentation of *Stachybotrys microspora*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 61:432-440.
2. Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 281:1322-1326.
3. Anderson RD, Bell AS, Blanford S, Paaijmans KP, Thomas MB (2011) Comparative growth kinetics and virulence of four different isolates of entomopathogenic fungi in the house fly (*Musca domestica* L.) *J. Invertebr. Pathol.* 107:197-184.
4. Baraja PC (2009) La ruta RAS-ERK como diana antitumoral. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia
5. Barranco FE, Bustamante CP, Mayorga RL., González CR, Martínez CP, Azaola A (2009) β -N-acetylglucosaminidase production by *Lecanicillium lecanii* ATCC 26854 by solid-state fermentation utilizing shrimp shell. *Interciencia* 34:1-5.
6. Barranco-Flrido JE, Rosas-Alatorre R, Gutiérrez-Rojas M, Viniestra-González G, Saucedo-Castañeda G (2002) Criteria for the selection of strains of entomopathogenic fungi *Verticillium lecanii* for solid state cultivation. *Enz. Microbiol. Technol.* 30:910-915.
7. Barranco-Flrido E, García-Hernandez LA, Rodríguez-Navarro S, Flores-Macías A, Ramos-López MA (2013) Regulación of gene expression in entomopathogenic fungi in three different environmental conditions: A review. *Afr. J. Biotechnol.* 12:989-995.
8. Behera SS & Ray RC (2016) Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies. *Int. J. Biol. Macromol.* 86:656-669.
9. Benz R (1978) Alkali ion transport through lipid bilayer membranes mediated by enniatin A and B and beauvericin. *J. Membr. Biol.* 43:367-94.
10. Castlebury LA, Sutherland JB, Tanner LA, Henderson AL, Cerniglia CE (1999)

- Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 15:119-121.
11. Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410:37-40
 12. Chen A, Wang Y, Shao Y, Zhou Q, Chen S, Wu Y, Chen H, Liu E (2017) Genes involved in *Beauveria bassiana* infection to *Galleria mellonella*. *Arch. Microbiol.* 1:1-12
 13. Chen BF, Tsai MC, Jow GM (2006) Induction of calcium influx from extracellular fluid by beauvericin in human leukemia cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 340:134-139.
 14. Cheng C, Chang K, Lee Y (2009) Antiproliferative effect of beauvericin on retinoblastoma. *Fu-Jen J. Med.* 7:167-169.
 15. Cheng C, Sun J, Zheng F, Wu K, Rui Y (2014) Molecular identification of clinical “difficult-to-identify” microbes from sequencing 16S ribosomal ADN and internal transcribed spacer 2. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 13:1-7.
 16. Črešnar B, Petrič Š (2011) Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochim. Biophys. Acta.* 1814:29-35.
 17. Costa EMMB, Pimenta FC, Luz C, Oliveira V, Olivera M, Bueno E, Petrofeza S (2011). *Beauveria bassiana*: Quercetinase production and genetic diversity. *Braz. J. Microbiol.* 42:12-21.
 18. D’Alessandro CP, Jones LR, Humber RA, Lastra CCL, Sosa-Gomez DR (2014) Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. Strains (Acomycota: Hypocreales) using ITS-1-5.8S-ITS2 and elongation factor 1-alpha sequences. *J. Basic Microbiol.* 54:21-31.
 19. Do Nascimento AM, Conti R, Turatti ICC, Cavalcanti BC, Costa-Lotufo L, Pessoa C, Moraes MO, Manfrim V, Toledo JS, Cruz AK, Pupo MT (2012) Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22:1276-1281.
 20. Estrada ME, Camacho MV, Benito C (2007) The molecular diversity of different isolates of *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. as assessed using intermicrosatellites (ISSRs). *Cell. Mol. Biol. Lett.* 12:240-252.

21. Ezra D, Hess WM, Strobel GA (2004) New endophytic isolates of *Muscodora albus*, a volatile-antibiotic-producing fungus. *Microbiology*. 150:4023-4031.
22. Faria MR & Wraight (2007) Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biocontrol*. 43:237-256.
23. Farinas CS (2015) Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 52:179-188.
24. Farmer JJ, Davis BR, Hickman-Brenner FW, McWhorter A, Huntley GP, Asbury CMA, Riddle C, Wathen-Grady HG, Elias C, Fanning GR, Steigerwalt AG, O'hara CM, Morris GK, Smith PB, Brenner DJ (1985) Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 21:46-76
25. Fernandes EKK, Costa GL, Moraes AML, Zahner V, Bittencourt VRE (2006) Study on morphology, pathogenicity, and genetic variability of *Beauveria bassiana* isolates obtained from *Boophilus microplus* tick. *Parasitol. Res.* 98:324-332.
26. Fernandes EKK, Moraes AML, Pacheco RS, Rangel DEN, Miller MP, Bittencourt VRE, Roberts DW (2009) Genetic diversity among Brazilian isolates of *Beauveria bassiana*: comparisons with non-Brazilian isolates and other *Beauveria* species. *J. Appl. Microbiol.* 107:760-774.
27. Fernandes EKK & Bittencourt VRE (2008) Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp. Appl. Acarol.* 46:71-93.
28. Ferri DV, Munhoz CF, Neves PMO, Ferracin LM, Sartori DP (2012) Genetic variability of *Beauveria bassiana* and a ADN marker for environmental monitoring of a highly virulent isolate against *cosmopolites sordidus*. *Indian. J. Microbiol.* 52:569-574.

29. Galidevara S, Reineke A, Koduru UD (2016) *In vivo* expression of genes in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* during infection of lepidopteran larvae. J. Invertebr. Pathol. 136:32-34.
30. Gallou A, Serna-domínguez MG, Berlanga-Padilla AM, Ayala-Zermeño MA, Mellín-Rosas MA, Montesinos-Matías R, Arredondo-Bernal HC (2016) Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Lividae) in Mexico. Fungal biol. 120:414-423.
31. Ganassi S, Moretti A, Pagliai AMB, Logrieco A, Sabatini MA (2002) Effects of beauvericin on *Schizaphis graminum* (Aphididae). J. Invertebr. Pathol. 80:90-96.
32. Giuliano GD, Krasnoff SB, Sun-moon Y, Churchill ACL, Gibson DM (2012) Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii*. Curr. Genet. 58:105-16.
33. Gonçalves HB, Jorge JA, Guimaraes LHS (2016) Production and characterization of an extracellular β -D-fructofuranosidase from *Fusarium graminearum* during solid-state fermentation using wheat bran as a carbon source. J. Food. Biochem. 40:655-663.
34. González AM, Presa M, Latorre MG, Lura MC (2007) Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre artemia salina. Rev. Iberoam Micol. 24:59-61.
35. Graminha EBN, Gonçalves AZL, Pirota RDPB, Balsalobre MAA, Da Silva R, Gomes E (2008) Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. Anim Feed Sci Technol. 144:1-22.
36. Grove JF & Pople M (1980) The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. Mycopathologia 70:103-105.
37. Gupta S, Krasnoff SB, Underwood NL, Renwick JAA, Roberts DW (1991) Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and

- Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Mycopathologia*. 115:185-189.
38. Hamill RL, Higgins CE, Boaz ME, Gorman M (1969) The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett.* 49:4255-4258.
 39. Heilos D, Rodríguez-Carrasco Y, Englinger B, Timelthaler G, Schoonhoven S, Sulyok M, Boecker S, Süssmuth RD, Heffeter P, Lemmens-Gruber R, Dornetshuber-Fleiss R, Berger W (2017) The natural fungal metabolite beauvericin exerts anticancer activity *in vivo*: A pre-clinical pilot study. *Toxins* 9:258.
 40. Heredia A, Aguilar-Franco M, Magaña C, Flores C, Piña C, Velázquez R, Schäffer TE, Bucio L, Basiuk VA (2007) Structure and interactions of calcite spherulites with α -chitin in the brown shrimp (*Penaeus aztecus*) shell. *Mater. Sci. Eng. C* 27:8-13.
 41. Hinrikson HP, Hurst SF, Lott TJ, Warnock DW, Morrison CJ (2005) Assessment of ribosomal Large-Subunit D1-D2, Internal transcribed spacer1, and Internal spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *JCM*. 43:2092-2103.
 42. Hölker U, Höfer M, Lenz J (2003) Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:175-186.
 43. Huang BF & Feng MG (2009) Comparative tolerances of various *Beauveria bassiana* isolates to UV-B irradiation with a description of a modeling method to assess lethal dose. *Mycopathologia*. 168:145-152.
 44. Ivanov TV, Evstratov AV, Sumskaia LV, Melnik EI, Chumburidze TS, Portnova SL, Balashova TA, Ovchinnikov Yu A (1973) Sandwich complexes as a functional form of the enniatin ionophores. *FEBS. Letters*. 36:65-71.
 45. Jain A, Morlok CK, Henson JM (2013) Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 97:905-917.
 46. Jiang X, Cheng YJ, Shi LG (2013) Determination of *Fusarium* micotoxina

- beauvericin in *Bombyx batryticatus* by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Asian J. Chem.* 25:6693-6696.
47. Jing-Jie W, Li Y, Xin Q, Yong-Gui L, Wei Z, Yong-Ji W (2013) Diversity analysis of *Beauveria bassiana* isolated from infected silkworm in southwest China based on molecular data and morphological features of colony. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29:1263-1269.
 48. Jirakkakul J, Punya J, Pongpattanakitsote PP, Vorapreeda N, Tachaleat A, Klomnara C, Tanticharoen M, Cheevadhanarak (2008) Identification of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for bassianolide synthesis in wood-decaying fungus *Xylaria spp.* BCC1067. *Microbiology* 154:995-1006.
 49. Jow G, Chou C, Chen B, Tsai J (2004) Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: The causative role of calcium. *Cancer Lett.* 216:165–173.
 50. Kepler RM and Rehner SA (2013) genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Mol. Ecol. Resour.* 13:210-2017.
 51. Kepler RM, Ugine TA, Maul JE, Cavigelli MA, Rehner SA (2015) Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environ. Microbiol.* 17:2791-2804.
 52. Kim S, Lee SJ, Nai YS, Yu JS, Lee MR, Yang YT, Kim JS (2016) Characterization of T-ADN insertion mutants with decreased virulence in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* JEF-007. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:8889-8900.
 53. Kouri K, Duchon M, Lemmens R (2005) Effects of beauvericin on the metabolic state and ionic homeostasis of ventricular myocytes of the guinea pig. *Chem. Res. Toxicol.* 18:1661-1668.
 54. Kouri K, Lemmens M, Lemmens-Gruber R (2003) Beauvericin induced channels in ventricular myocytes and liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1609:203–210.
 55. Lai Y, Chen H, Wei G, Wang G, Li F, Wang S (2017) *In vivo* gene expression

- profiling of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* its infection stratagems in *Anopheles* mosquito. *Sci China Life Sci.* 8:839-851.
56. Lee H, Jang Y, Choi YS, Kim MJ, Lee J, Lee H, Hong JH, Lee YM, Kim GH, Kim JJ (2014) Biotechnological procedures to select white rot fungi for the degradation of PAHs. *J Microbiol. Methods.* 97:56-62.
 57. Lin H, Lee Y, Chen B, Tsai M, Lu J, Chou C, Jow G (2005) Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 230:248-259.
 58. Liuzzi, VC, Mirabelli V, Cimmarusti MT, Haidukowski M, Leslie JF, Logrieco AF, Caliandro R, Fancesca F, Mule G. (2017). Enniatin and beauvericin biosynthesis in *fusarium* species: Production profiles and structural determinant prediction. *Toxins.* 9:45.
 59. Llanos R, Chevrier V, Ronjat M, Meurer-Grob P, Martinez P, Frank R, Bornens M, Wade RH, Wehland J, Job Didier (1999) Tubulin binding sites on γ -tubulin: Identification and molecular characterization. *Biochem.* 38:15712-15720.
 60. Logrieco A, Rizzo A, Ferrance R, Ritieni A (2002) Occurrence of Beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:82-85.
 61. Longo MA, Sanromán MA (2006) Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. *Food Technol. Biotechnol.* 44:335-353.
 62. Luangsa-Ard JJ, Berkaew P, Ridkaew R, Hywel-Jones NL, Isaka M (2009) A beauvericina hot spot in the genus *Isaria*. *Mycol. Res.* 113:1389-1395.
 63. Lu CL, Lin HI, Chen BF, Jow G-M (2016) Beauvericin-induced cell apoptosis through the mitogen-activated protein kinase pathway in human nonsmall cell lung cancer A549 cells. *J. Toxicol. Sci.* 41:429–437.
 64. Luke JJ, Ott PA, Shapiro GI (2014) The biology and clinical development of mek inhibitors for cancer. *Drugs.* 74:2111–2128
 65. McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss MM, Andersen P (1996) The Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation, *Experientia.* 52: 1008–1017.

66. Mascarin GM, Jackson MA, Behle RW, Kobori NN, Júnior ID (2016) Improved shelf life of dried *Beauveria bassiana* blastospores using convective drying and active packaging processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100:8359-8370.
67. Matsumoto Y, Saucedo-Castañeda G, Revah G, Shirai K (2004) Production of β -N-acetylhexosaminidase of *Verticillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process. Biochem.* 39:665-671.
68. Mayorga-Reyes L, Calderón-Garza E, Gutiérrez-Nava A, González-Cervantes R, Azaola-Espinosa A, Barranco-Flrido E (2012) Characterization and expression of the chitinase CHIT II gene from *Lecanicillium lecani* in solid-state fermentation. *Rev. Mex. Ing. Quim.* 11;97-104.
69. Meca G, Sospedra L, Soriano JM, Ritiene A, Moretti A, Mañes J (2010) Antibacterial effect of the bioactive compound beauvericin produced by *Fusarium proliferatum* on solid medium of wheat. *Toxicon.* 56:349-354.
70. Meyling NV & Eilenberg J (2007) Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol. Control.* 43:145-155.
71. Michels J, Appel E, Gorb SN (2016) Functional diversity of resilina in Arthropoda. *Beilstein J. Nanotechnol.* 7:1241-1259.
72. Nagavalli M, Ponamgi SPD, Girijashankar V, Rao V (2015) Solid state fermentation and production of Rifamycin SV using *Amycolatopsis mediterranei*. *Lett. Appl. Microbiol.* 60:44-51.
73. Nilanonta C, Isaka M, Kittakoo P, Trakulnaleamasai S, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y (2002) Precursor-directed biosynthesis of beauvericin analogs by the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Tetrahedron.* 58:3355-3360.
74. Oakley BR (2000) An abundance of tubulinas. *Trends Cell Biol.* 10:537-542.
75. Oliveira DG, Pauli G, Mascarin GM, Delalibera I (2015) A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* forma commercial products. *J. Microbiol.*

- Methods. 119:44.52.
76. Oliveira F, Moreira C, Salgado JM, Abrunhosa L, Venâncio A, Belo I (2016) Olive pomace valorization by *Aspergillus* species: lipase production using solid-state fermentation SCI. 96:3583-3589.
 77. Pérez-Sánchez A, Uríbe-Carvajal S, Cabrera-Orefice A, Barrios-González J (2017) Key role of alternative oxidase in lovastatin solid-state fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 101:7347-7356.
 78. Poczai P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen JPT, Hyvönen J (2013) Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. Plant Methods. 9:6.
 79. Prince RC, Crofts AR, Steinrauf LK (1974) A comparison of beauvericin, enniatin and valinomycin as calcium transporting agents in liposomes and chromatophores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 59:697-703
 80. Prior IA, Lewis PD, Mattos C (2012) A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. Cancer Res. 72:2457–2467.
 81. Pucheta DM, Flores MA, Rodríguez NS, De la torre M (2006) Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. Interciencia. 31:856-860.
 82. Rachmawati R, Kinoshita H, Nihira T (2018) Production of insect toxin beauvericin from entomopathogenic fungi *Cordyceps militaris* by heterologous expression of global regulator. J. Agric. Sci. 40:177-184.
 83. Rehner SA and Buckley Ellen (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. Micologia 97:84-98.
 84. Ren Y, Zhang Y, Shao S, Cai Z, Feng L, Pan H, Wang Z (2007) Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1143:48-64.
 85. Ríos RP, González RA, Sánchez CF, Murguía MP (2015) Tendencia de mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. Evid. Med. Invest. Salud. 8:5-15.
 86. Rondot Y, Reineke A (2018) Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. Bio. Control.

116:82-89.

87. Ruiz-Leza, HA, Rodríguez-Jasso, RM, Rodríguez-Herrera, R, Contreras-Esquivel and JC. Aguilar, CN (2007) Bio-reactors design for solid state fermentation. Rev. Mex. Ing. Quím. 6:33-40.
88. Sath PK, Duhan S, Duhan JS (2018) Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. Bioresour. Bioprocess. 5:1.
89. Santos VL, Linardi VR (2003) Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents- identification and degradation potencial. Process. Biochem. 39:1001-1006.
90. Sewram V, Nieuwoudt, Marasas WFO, Shephard GS, Ritieni A (1999) Determination of the *Fusarium mycotoxins*, fusaproliferin and beauvericin by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 858:175-185.
91. Shin CG, An DG, Song HH, Lee C (2009) Beauvericin and enniatins H, I and MK1688 are new potent inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. J. Antibiot. (Tokyo) 62:687-690.
92. Singhanian RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A (2009) Recent advances in solid-state fermentation. Biochem. Eng. J. 44:13-18.
93. Sivanathan S & Scherckenbeck J (2014) Cyclodepsipeptides: A Ricj Source of Biologically Active Compounds for Drug Research. Molecules 19:12368-12420.
94. Solomon KV, Henske JK, Theodorou MK, O'Malley MA (2016) Robust and effective methodologies for cryopreservation and ADN extraction from anaerobic gut fungi. Anaerobe. 38:39-46.
95. Sood S, Sandhu S, Mukherjee TK (2017) Pharmacological and therapeutic potential of beauvericin: A short review. J. Proteomics. Bioinform. 10(1):18-23.
96. Süssmuth RD, and Mainz A (2017) Nonribosomal peptide synthesis-principles and prospects. Angew. Chem. Int. Ed. 56:3770-3821.
97. Tabaraie B, Ghasemian E, Tabaraie T, Parvizi E, Rezazarandi M (2012) Comparative evaluation of cephalosporin-C production in solid state fermentation and submerged liquid cultura. J. Microbiol. Biotechnol. Food. Sci.

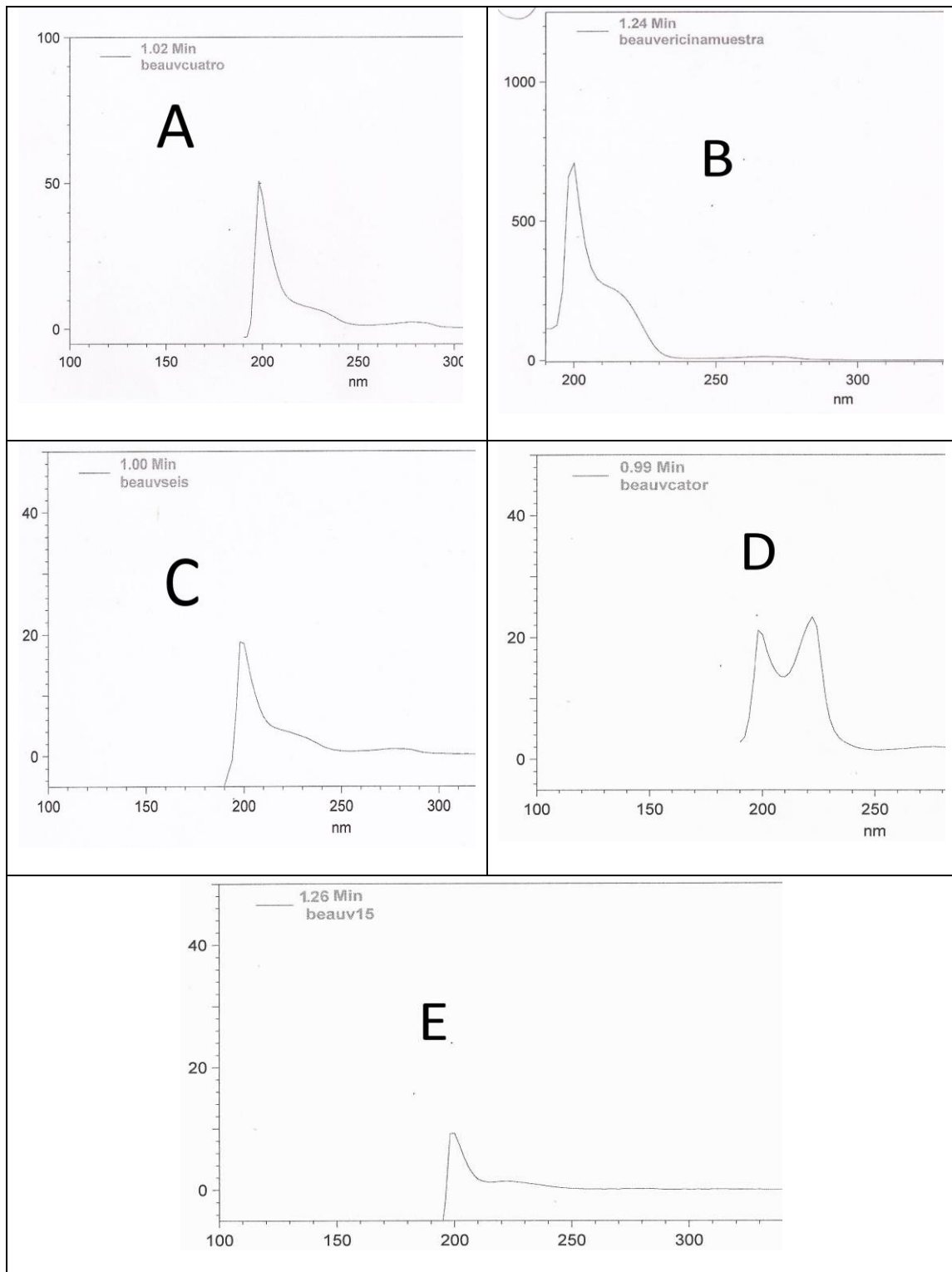
2:83-94.

98. Tao YW, Lin YC, She ZG, Lin MT, Chen PX, Zhang JY (2015) Anticancer activity and mechanism Investigation of beauvericin isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi. *Anticancer. Agents. Med. Chem.* 15:258-266.
99. Tapia-Tussell R, Lappe P, Ulloa M, Quijano-Ramayo A, Cáceres-Farfán M, Larqué-Saavedra A, Perez-Brito D (2006) A rapid and simple method for ADN extraction from yeasts and fungi isolated from agave fourcroydes. *Mol. Biotechnol.* 33:67-70.
100. Thomas L, Larroche C, Pandey A (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* 81:146-161.
101. Valencia AJW, Bustamante GAL, Jiménez VA, Grossi-de-Sá FM (2011) Cytotoxic activity of fungal metabolites from the pathogenic fungus *Beauveria bassiana*: An intraspecific evaluation of beauvericin production. *Curr. Microbiol.* 63:306-312.
102. Van Burik, Schreckhise, White, Bowden Myerson (1998) Comparison of six extraction techniques for isolation of ADN from filamentous fungi. *Medical Mycology.* 36: 299–303
103. Vicent JFV & Wegst UGK (2004) Design and mechanical proprieties of insect cuticule. *Arthropod. Struct. Dev.* 33:187-199.
104. Viniegra-González G, Favela-Torres E, Aguilar NC, Romero-Gomez S, Díaz-Godínez G, Augur C (2003) Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochem. Eng. J.* 13:157-167.
105. Wang JJ, Yang L, Qiu X, Liu YG, Zhou W, Wan YJ (2013) Diversity analysis of *Beauveria bassiana* isolated from infected silkworm in southwest China based on molecular data and morphological features of colony. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 29:1263-1269.
106. Wang Q, Xu L (2012) Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules.* 17:2367-2377.
107. Wang QX, Li SF, Zhao F, Dai HQ, Bao L, Ding R, Liu HW (2011) Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*.

- Fitoterapia. 82:777–781.
108. Wätjen W, Debbab A, Hohlfeld A, Chocou Y, Proksch P (2014) The mycotoxin beauvericin induces apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by an inhibition of NF- κ B-activity and modulation of MAP-Kinases. *Toxicol. Lett.* 232:9-16.
 109. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic. Press. 315-322.
 110. Xiao G, Ying SH, Zheng P, Wang ZL, Zhang S, Xie XQ, Shang Y, Leger RJ, Zhao GP, Wang C, Feng MG (2012) Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Sci. Rep.* 2:483.
 111. Xu Y, Orozco R, Wijeratne EMK, Espinosa-Artiles P, Gunatilaka AAL, Stock SP, Molnár I (2009) Biosynthesis of the cyclooligomer depsipéptido bassianolido, an insecticidal virulence factor of *Beauveria bassiana*. *Fungal Genet. Biol.* 46:353-364.
 112. Xu Y, Zhan J, Wijeratne EMK, Burns AM, Gunatilaka AAL, Molnár I (2007) Citotoxic and antihaptotactic beauvericin analogues from precursor-directed biosynthesis with the insect pathogen *Beauveria bassiana* ATCC 7159. *J. Nat. Prod.* 70:1467-1471.
 113. Yang SQ, Xiong H, Yang HY, Yan QJ, Jiang ZQ (2015) High-level production of β -1,3-1,4-glucanasa by *Rhizomucor miehei* under solid-state fermentation and its potential application in the brewing industry. *J. Appl. Microbiol.* 118:84-91.
 114. Yang ZY, Chao Z, Huo KK, Xie H, Tian ZP, Pan SL (2007) ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China. *Phytomedicine* 14:416-422.
 115. Yazid NA, Barrena R, Komilis D, Sánchez A (2017) Solid-state fermentation as a novel paradigm for organic waste valorization: a review. *Sustainability*. 9:224.
 116. Yu J, Zhang X, Tan T (2008) Ethanol production by solid state

- fermentation of sweet sorghum using thermotolerant yeast strain. *Fuel. Process. Technol.* 89:1056-1059.
117. Zhang L, Yan K, Zhang Y, Huang R, Bian J, Zheng C, Sun H, Chen Z, Sun N, An R, Min Z, Zhao W, Zhuo Y, You, J, Song Y, Yu Z, Liu Z, Yang K, Gao H, Dai H, Zhang X, Wang J, Fu C, Pei G, Liu J, Zhang S, Goodfellow M, Jiang Y, Kuai J, Zhou G, Chen X (2007) High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 104:4606-4611.
118. Zhang T, Zhuo Y, Jia X, Liu J, Gao H, Song F, Liu M, Zhang L (2013) Cloning and characterization of the gene cluster required for beauvericin biosynthesis in *Fusarium proliferatum*. *Sci. China.* 56:628-637.
119. Zobel S, Boecker S, Kulke D, Heimbach D, Meyer V, Süssmuth RD (2016) Reprogramming the biosynthesis of cyclodepsipeptide synthetases to obtain new enniatins and beauvericins. *Chem. Bio. Chem.* 17:283-287.

9. ANEXOS



Anexo 1. Espectros de los picos de las fracciones obtenidas del tamiz molecular con tiempo de retención más cercanos al estándar de BEA. A: fracción 4. B: fracción 5. C: fracción 6. D: fracción 14. E: fracción 15.



XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería

25 al 30 de junio de 2017, Puerto Vallarta, Jalisco

AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN *BbBEAS* (BEAUVERICINA SINTETASA) CORRESPONDIENTE A LA VÍA DE SÍNTESIS DE BEAUVERICINA

José Norberto Vásquez Bonilla¹; Juan Esteban Barranco Florido²; María Angélica Gutiérrez Nava²; Marcela Hurtado y de la Peña². ¹Maestría en Ciencias Farmacéuticas, ²Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Ciudad de México C.P. 14387. Correo electrónico del responsable del trabajo: norberto.vasquez.bonilla@gmail.com

Palabras clave: Hongos entomopatógenos, Secuencias conservadas, Beauvericina.

Introducción. La beauvericina es una reconocida micotoxina producida por algunos hongos entomopatógenos, tales como *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) y *Fusarium spp.*⁽¹⁾ y forma parte de una familia de compuesto llamada depsipéptidos cíclicos los cuales en su mayoría son de origen natural especialmente producidos por microorganismos.⁽²⁾ El interés de esta clase de metabolitos en la comunidad científica se debe a sus interesantes mecanismos de acción en su amplia gama de actividades biológicas tales como inmunosupresor, antibiótico, antifúngico, antiinflamatorio, actividades antitumorales y antivirales⁽³⁾ demostrando su mayor potencial terapéutico como agentes anticancerosos⁽⁴⁾. La biosíntesis de la beauvericina a partir de la especie *B. bassiana* requiere de una fuente rica en nitrógeno y una rica en carbono, y se lleva a cabo por la enzima beauvericina sintetasa⁽⁵⁾.

El objetivo de este trabajo es amplificar parcialmente el gen codificante de la beauvericina sintetasa en *B. bassiana* para el monitoreo de sus niveles de expresión.

Metodología. La amplificación parcial del gen de la Beauvericina sintetasa se realizó por la técnica de PCR con el diseño de los oligonucleótidos Forward: 5'-ATT GGA TGA TGG CTA CAC CG-3' y Reverse: 5'-CTT TCC GGT GGC AGT GCG-3' los cuales fueron diseñados basándose en el alineamiento de las secuencias conservadas del gen de la beauvericina sintetasa en diferentes cepas de *B. bassiana* y *Fusarium spp.* La reacción de PCR fue con las siguientes condiciones: 5 min. de desnaturalización inicial a 94°C, 30 ciclos de 30 seg. de desnaturalización a 94°C, 30 seg. de alineamiento a 60°C, 45 seg. de extensión a 72°C y 7 min. de extensión final a 72 °C. Los productos de PCR se analizaron con electroforesis de gel de agarosa al 1%, posteriormente se purificó utilizando el kit QIAquick PCR Purification Gel Kit[®] y finalmente se secuenció.

Resultados. Con los oligonucleótidos diseñados se obtiene un fragmento de aproximadamente 750pb en el gel de agarosa al 1% (Fig. 1).



Fig. 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Carril 1 marcador, carril 2 control negativo, carril 3 control positivo y carril 4 el producto de PCR.

La secuenciación mostró que el fragmento amplificado con los oligonucleótidos diseñados tiene un tamaño de 778pb. y basándose en la base de datos de GenBank de nucleótidos es 97% idéntico al gen de la beauvericina sintetasa que corresponde a la vía de síntesis de la beauvericina en la especie *B. bassiana*. Además posee una similitud superior al 70% con el gen correspondiente a la misma vía de síntesis en otras especies de hongos entomopatógenos como *Fusarium spp.*

Conclusiones. El producto de PCR obtenido pertenece a un fragmento del gen de la beauvericina sintetasa en la especie *B. bassiana* y los oligonucleótidos diseñados pueden ser utilizados para monitorear los niveles de expresión de esta enzima en *B. bassiana* lo cual permitirá evaluar la producción de beauvericina en diferentes medios y condiciones de cultivo.

Agradecimiento. Se agradece a CONACyT por el apoyo económico brindado durante esta investigación.

Bibliografía.

1. Wang Q., Xu L. 2012. *Molecules*. 17(3): 2367-2377.
2. Hamada Y., Shioiri T. 2005. *Chem. Rev.* 105(12): 4441-4482.
3. Sarabia F., Chammaa S., Ruiz A, Ortiz L, Herrera F. 2004. *Curr. Med. Chem.* 11(10): 1309-1332.
4. Tao Y, Lin Y, She Z, Lin M, Chen P, Zhang J. 2015. *Anticancer Agents Med. Chem.* 15 (2):258-266.
5. Xu Y., Orozco R., Wijeratne E, Gunatilaka A, Stock S, Molnár I. 2008. *Chem. Biol.* 15(9):898-907.



Anexo 3. Constancia por haber presentado el cartel titulado: **AMPLIFICACIÓN PARCIAL DEL GEN BBBEAS (BEAUVERICINA SINTETASA) CORRESPONDIENTE A LA VÍA DE SINTESIS DE LA BEAUVERICINA** en el XVII congreso de biotecnología y bioingeniería



Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Nicolás San Juan No. 1511 Colonia del Valle
Delegación Benito Juárez C.P. 03100
México, D.F.
Tel: 9183-2060
www.afmac.org.mx

Expediente: 651

México, D.F. a 6 de noviembre de 2017

Q.F.B. José Norberto Vásquez-Bonilla
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco

Presente

Estimado químico Vásquez:

Tengo el agrado de comunicarle que el artículo perteneciente a la sección **Revisiones Bibliográficas** intitulado:

“Actividad biológica de la micotoxina beauvericina en células cancerosas”

de los autores *José Norberto Vásquez-Bonilla, Elani Julissa Cabrera-Vega, José Ignacio Vázquez-Olvera, María Angélica Gutiérrez-Nava, Marcela Hurtado- y de la Peña, Juan Esteban Barranco-Florido*, ha sido aceptado para su publicación en la *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* en el Vol. 48, No. 4 octubre-diciembre 2017.

La Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas está indizada a: Internacional Pharmaceutical Abstracts, Chemical Abstracts, EMBASE de Excerpta Medica, Latindex, Índice de Revistas Mexicanas de Investigación Científica y Tecnología del CONACyT (expediente No. 66688) y a la Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal (Redalyc).

Esperando contar nuevamente con material de su autoría, quedo de usted.

Atentamente

Por la superación Técnica y Científica

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad
Editor

c.c.p. Dr. Vicente Jesús Hernández Abad Editor RMCF
c.c.p. Archivo AFMAC

F-ER-AFM-018

Anexo 4. Carta de aceptación del artículo titulado: Actividad biológica de la beauvericina en células cancerosas en la revista nacional de ciencias farmacéuticas

Anexo 5. Artículo publicado en la revista nacional de ciencias farmacéuticas

Revisión bibliográfica

Actividad biológica de la micotoxina beauvericina en células cancerosas

Biological activity of mycotoxin beauvericin in cancer cells

José Norberto Vásquez-Bonilla, Elani Julissa Cabrera-Vega, José Ignacio Vázquez-Olvera, María Angélica Gutiérrez-Nava, Marcela Hurtado- y de la Peña, Juan Esteban Barranco-Florida

Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. México.

Resumen

La beauvericina, una micotoxina producida por *Beauveria bassiana* y *Fusarium* spp, tiene diversas actividades biológicas: antimicrobiana, antifúngica, antiviral y antitumoral. Ha demostrado su potencial terapéutico como agente anticanceroso en líneas celulares de cáncer de pulmón, leucemia, prostático y carcinoma epidermoide. Además, ha demostrado reducir el crecimiento de tumores (retinoblastoma y cáncer de colon) en modelos murino y células humanas del carcinoma cervical. El mecanismo de la beauvericina involucra la vía de las MAPK: MEK1/2-ERK42/44-90RSK y la vía mitocondrial con: incremento en la concentración de calcio intracelular, la participación de proteínas Bcl-2, cambios en el potencial de membrana mitocondrial y activación de caspasas. La beauvericina también es un inhibidor de la metástasis y angiogénesis con una mejor actividad citotóxica que otros compuestos análogos. La beauvericina tiene una importante área de oportunidades para la investigación farmacéutica.

Abstract

Beauvericin is a mycotoxin produced by *Beauveria bassiana* and *Fusarium* spp. it has various biological activities: antimicrobial, antifungal, antiviral and antitumor, It has shown a therapeutic potential as anticancer agent in cancer cell lines, mainly lung cancer, leukemia, prostate cancer and epidermoid carcinoma, also reduces the tumor growth (retinoblastoma and colon cancer) in murine model and human cervical carcinoma cells. The beauvericin mechanisms involved the MAPK pathway: MEK1/2-ERK42/44-90RSK and the mitochondrial pathway with: increase in intracellular calcium concentration, the participation of Bcl-2 proteins, changes in mitochondrial membrane potential and activation of caspases. Beauvericin is also an inhibitor of metastasis and angiogenesis with a better cytotoxic activity than other analogous compounds. Beauvericin has a large area of opportunities for pharmaceutical research.

Palabras clave: beauvericina, actividad citotóxica, actividad antitumoral.

Key words: beauvericin, cytotoxic activity, antitumor activity.

Correspondencia:

Q.F.B. José Norberto Vásquez-Bonilla
Departamento de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco
Del Hueso 1100
Villa Quietud, C.P. 04960
Coyoacán, Ciudad de México, México
Correo electrónico: norberto.vasquez.bonilla@gmail.com

Fecha de recepción: 6 de julio de 2017

Fecha de recepción de modificaciones: 3 de noviembre de 2017

Fecha de aceptación: 6 de noviembre de 2017

Introducción

La mayor fuente de nuevos productos químicos con actividades biológicas para las aplicaciones terapéuticas ha sido siempre la naturaleza. En el área de oncología, desde los años 40, de las 155 moléculas aprobadas para el tratamiento del cáncer, el 73 % de ellas no son sintéticas, y de éstas el 47 % son productos naturales o compuestos directamente derivados de ellos.¹ Los hongos producen una gran cantidad de metabolitos con amplia aplicación en medicina, entre ellos podemos mencionar a los hongos entomopatógenos que infectan y controlan insectos plaga,² para hacerlo sintetizan depsipéptidos cíclicos con actividad antitumoral.

Los depsipéptidos cíclicos se caracterizan por estar formados de hidroxiaácidos y aminoácidos unidos por enlaces amida y éster. El interés que esta clase de metabolitos ha suscitado en la comunidad científica se explica por su amplia gama de actividades biológicas,³ interesantes mecanismos de acción y atractiva arquitectura molecular ya que muchos depsipéptidos muestran una variedad de efectos biológicos muy prometedores tales como inmunosupresor, antibiótico, antifúngico, antiinflamatorio, actividades antitumorales y antivirales demostrando su mayor potencial terapéutico como agentes anticancerosos y actividad antiproliferativa de amplio espectro contra diferentes líneas celulares de cáncer humano, tales como de carcinoma pulmonar, leucemia y de próstata, mediante la activación de las vías de apoptosis mediadas por canales de calcio.^{4,5} Por lo que resulta prometedor el estudio de estos depsipéptidos como lo es la beauvericina, ya que es factible su producción por cultivo sólido y los microorganismos que la producen son inocuos para el ser humano.

En el presente trabajo se expone una revisión sobre la potencial actividad biológica de la beauvericina como agente antitumoral en ensayos *in vitro* e *in vivo*, así como una discusión de los diferentes mecanismos de acción propuestos a nivel celular.

Beauvericina

La beauvericina es una reconocida micotoxina producida por algunos hongos entomopatógenos, tales como *Beauveria bassiana* (*B. bassiana*) y *Fusarium* spp.⁶ y forma parte de una familia de compuesto llamada depsipéptidos cíclicos los cuales en su mayoría son producidos por microorganismos.² La beauvericina fue aislada por primera vez de *B. bassiana*,⁶ especie que se ha comercializado para controlar diferentes plagas de importancia agrícola.⁷

La síntesis de la beauvericina se lleva a cabo por un mecanismo no ribosomal propio de los hongos el cual requiere de una fuente rica en nitrógeno, una de carbono y de la enzima beauvericina sintetasa (BbBEAS en *B. bassiana*) la cual posee un peso molecular de 351 kDa y lleva a cabo la biosíntesis utilizando D-2-hidroxiisovalerato (D-HYIV) y L-fenilalanina (L-Phe) como sustratos.⁶ Sin embargo existen dos depsipéptidos sintetasa más, las cuales difieren con la beauvericina sintetasa en cuanto a la selectividad de los sustratos y preferentemente aceptan N-metil-L-fenilalanina y algunos otros aminoácidos con cadenas alifáticas hidrofóbicas lo que da lugar a seis análogos de beauvericina,⁷⁻¹¹ por otro lado si se utiliza el ácido DL-2-hexabutírico (Hbu) y la DL-3-fluorofenilalanina como sustratos se obtienen seis derivados de la beauvericina.¹²

Actividad biológica

El alcance de las posibles interacciones entre los microorganismos y otros sistemas vivientes a través de sus metabolitos secundarios es enorme, y las mismas constituyen una fuente inagotable para la obtención de nuevos metabolitos activos. El estudio de estas interacciones ha posibilitado que en la actualidad se conozca un gran número de metabolitos secundarios que presentan un variado espectro de actividades biológicas como la beauvericina.

La primer actividad biológica descrita de la beauvericina fue su actividad insecticida en 1969 por Hamill *et al.*,⁹ y en estudios posteriores con algunas especies de insectos.¹⁰ También se ha demostrado en diferentes estudios la actividad antibacteriana de la beauvericina,^{13,11,14} aunque se ha reportado su amplia gama de actividad antimicrobiana, su mecanismo de acción aún no ha sido elucidado, sin embargo, se ha propuesto que actúa sobre organelos celulares como ribosomas, núcleos celulares y enzimas.¹⁵ Otras actividades biológicas que se le han atribuido a la beauvericina es antifúngica en combinación con ketoconazol mostrando un efecto sinérgico¹⁶ y antiviral reduciendo la actividad de la integrasa del VIH-1.¹⁷

Actividad antitumoral

La función antitumoral de la beauvericina y la inducción de la apoptosis celular se ha demostrado en diferentes líneas celulares de cáncer: leucemia linfoblástica humana CCRF-CEM, carcinoma epidermoide KB y KBv200, cáncer de mama BC-1 y cáncer de mama metastásico MDA-MB-231, cáncer de pulmón de células no pequeñas A549, cáncer de próstata metastásico PC-3M, melanoma humano MDA-MB43, cáncer de colon humano HCT-8 y HCT1¹⁶, cáncer

cerebral SF295, hepatoma de rata H4IIE, hepatoma humano HepG2 (Tabla 1), y es llevada a cabo mediante diferentes mecanismos de acción.^{14,18-26}

Cáncer pulmonar

En México, el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte. El cáncer pulmonar específicamente, presenta una distribución de tasas de mortalidad por entidad federativa y sexo, siendo mayor en hombres y en los estados de Baja California Sur, Sinaloa, Sonora, Chihuahua y Nuevo León, su tasa de mortalidad estandarizada por edad a nivel nacional es de 8.0 %.¹⁸

Lin y colaboradores realizaron estudios donde demostraron la actividad apoptótica (citotóxica) de las micotoxinas beauvericina y bassiatina en células no pequeñas de cáncer de pulmón (NSCLC por sus siglas en inglés) A549 de la colección ATCC, mediante un análisis de cuenta viable con la prueba de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT por sus siglas en inglés); y morfológico, con la técnica de marcado de extremo terminal de la desoxinucleotidil transferasa dUTP (prueba TUNEL por sus siglas en inglés).¹⁹ Este estudio demostró que la beauvericina disminuye el índice de supervivencia celular con concentraciones entre 3 y 30 µM y que reduce

significativamente la sobrevivencia celular después de 24 horas con concentraciones entre 10 y 30 µM, en comparación con la bassiatina la cual no demostró tener actividad antitumoral utilizando las mismas concentraciones. Sin embargo, ambas micotoxinas no mostraron ser citotóxicas en células normales de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCaT). La CI₅₀ de la beauvericina, tras 24 horas de exposición, fue de 4.5±0.35 µM; los mecanismos de acción por los cuales la beauvericina indujo la apoptosis en este tipo de cáncer fueron: activación de caspasa 3, disminución del potencial de membrana y liberación del citocromo C, participación de la familia de proteínas Bcl-2. Así mismo, el estudio morfológico mostró la aparición de fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos.

En un estudio posterior,¹⁴ se evaluó la actividad citotóxica de beauvericina y de otros compuestos provenientes de *Fusarium oxysporum* (análogos de oxisporidinona, cerevisterol y fusarusida) mediante un análisis de supervivencia con la prueba MTT y tras 48 h de exposición en tres diferentes líneas celulares. La beauvericina mostró ser mejor agente citotóxico contra células de cáncer de próstata PC-3, cáncer de páncreas PANC-1 y cáncer de pulmón A549 con una CI₅₀ de 49.5±3.8 µM, 47.2±2.9 µM y 10.4±1.60 µM respectivamente. La beauvericina también presentó una mejor selectividad citotóxica hacia la línea celular de cáncer de pulmón, en

Tabla 1. Bioensayos sobre la actividad antitumoral *in vitro* de beauvericina.

Línea celular	Mecanismo de la actividad antitumoral de beauvericina	Referencia
Cáncer prostático PC-3, cáncer de páncreas PANC-1 y cáncer de pulmón A549.	No se propone	14
Cáncer de pulmón de células no pequeñas A549	Apoptosis mediante la vía de señalización MEK 1/2/ ERK42/44/90RSK	24
Cáncer de pulmón de células no pequeñas A549	Liberación de citocromo C, activación de caspasas y participación de proteínas: Familia Bcl-2	19
Células metastásicas de próstata PC-3M y metastásicas de cáncer de mama MDA-MB-231	Participación de proteínas: Familia Bcl-2. Liberación de citocromo C y activación de caspasas.	27
Leucemia CCRF- CEM	Liberación de citocromo C y activación de caspasas.	20
Carcinoma epidermoide KB, y cáncer de mama BC-1	No se propone	21
Carcinoma epidermoide KB y KBv200	Liberación de citocromo C y activación de caspasas.	22
Leucemia linfoblástica humana CCRF-CEM	Incremento de la concentración de calcio intracelular	23
Melanoma humano MDA-MB43, cáncer colón humano HCT-8 y cáncer cerebral SF295.	Incremento de la concentración de calcio intracelular	26
Hepatoma de rata H4IIE, hepatoma humano HepG2, carcinoma de colon humano HCT116 y células de glioma de rata C6.	Incremento de la actividad de caspasas e inhibición selectiva de la SRC MAP cinasas en H4IIE	25

comparación con el control positivo utilizado (cisplatino, CI_{50} de $19.8 \pm 2.4 \mu M$), los demás compuestos no demostraron tener una actividad citotóxica significativa (CI_{50} mayores a $100 \mu M$).

En ambas investigaciones, la beauvericina demostró tener mayor actividad citotóxica en comparación con otros compuestos análogos, esto demuestra su función como agente antitumoral en células de cáncer de pulmón. Su alta selectividad citotóxica por esta línea celular se observa en los valores de CI_{50} que son menores a las de fármacos utilizados para el tratamiento del cáncer como cisplatino.

Cáncer prostático y de mama metastásico

La utilización de fármacos citotóxicos es una de las terapias más utilizadas para el tratamiento del cáncer, la cual inhibe la proliferación celular de los tumores e induce a la apoptosis.²⁷ Desde el año 2003 se comenzó a tener más interés en investigaciones sobre la actividad anticancerígena en la migración celular, ya que se ha considerado como una estrategia alternativa para el desarrollo de terapias anticancerígenas.²⁸ Se ha reportado que la metástasis es responsable de más del 90% de muertes por cáncer.²⁹ La migración celular es una causa crítica de invasión de la enfermedad a otros tejidos permitiendo la formación de tumores primarios y su diseminación y metástasis. Así mismo, se sabe que la formación de tumores sólidos primarios depende de la angiogénesis, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos para la obtención del oxígeno y nutrientes necesarios que permitan el crecimiento del tumor.

Un estudio de la inhibición de la migración de células de cáncer de próstata metastásico PC-3M y mama metastásico MDA-MB-231, empleando el método de cicatrización (*Wound-healing*) determinó que la beauvericina producía una inhibición del 50 % de la migración celular utilizando concentraciones entre 2.0 - 2.5 y 3.0 - $4.0 \mu M$ respectivamente. Así mismo se evaluó la actividad antiangiogénica de beauvericina, midiendo su capacidad de interferir en la formación de células endoteliales (HUVEC-2), la CI_{50} fue de $3.0 \mu M$. La beauvericina demostró claramente tener actividad antiangiogénica y capacidad de inhibir la migración celular en ambas líneas celulares metastásicas a concentraciones subletales. La actividad citotóxica de la beauvericina también se comparó con otros compuestos análogos de oxisporidinona, bikaverina y 6-desoxibikaverina en diferentes líneas celulares como cáncer pulmonar de células no pequeñas NCI-H460, cáncer de páncreas MIA Pa Ca-2, cáncer de mamá MCF-7 y de glioma SF-268. Únicamente beauvericina y bikaverina mostraron actividad

antitumoral (CI_{50} de beauvericina: 1.41, 1.66, 1.81 y $2.29 \mu M$ respectivamente) así como citotoxicidad selectiva para NCI- H469 y MIA Pa Ca-2.²⁷

Los datos obtenidos en el estudio evidencian que la beauvericina actúa como un inhibidor de la metástasis y angiogénesis de células cancerosas, y que su actividad citotóxica es mejor que la de otros compuestos análogos.

Leucemia

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades que se distinguen por infiltración de la médula ósea, sangre y otros tejidos, por células neoplásicas del sistema hematopoyético.³⁰ En general las leucemias son la principal causa del cáncer pediátrico, siendo una enfermedad que sólo representa entre 0.5 y 3 % de todas las neoplasias malignas en el mundo; sin embargo, constituye un importante problema de salud pública, por la alta probabilidad de muerte a edades tempranas y por el impacto social en los pacientes pediátricos y sus familiares.³¹ La leucemia linfoblástica aguda se ha incrementado durante los últimos años; en México, ocupa el séptimo lugar en cuanto a mortalidad en niños de uno a cuatro años, con una tasa de 3.2/ 100,000 habitantes. Así mismo su incidencia en la Ciudad de México es una de las más altas en todo el mundo, esto coincide con la población hispana que vive en Estados Unidos, donde tienen mayor incidencia que otros grupos étnicos.³²

Las investigaciones que se han realizado con la beauvericina han demostrado que ésta también induce la muerte en células de leucemia linfoblástica humana CCRF-CEM, y que además su efecto citotóxico depende de la concentración y del tiempo de exposición. El efecto citotóxico fue cuantificado mediante la prueba con MTT, utilizando concentraciones de 1, 3, 5 y $10 \mu M$ durante 24 h, hallándose una considerable disminución de la supervivencia celular a partir de una concentración de $3 \mu M$. Basándose en los resultados obtenidos en este estudio, puede considerarse que la concentración y tiempo de exposición de las células a la beauvericina influye en la activación e intensidad del mecanismo de acción que lleva a la apoptosis celular como: la liberación del citocromo C, activación de la caspasa 3, fragmentación del DNA celular y formación de cuerpos apoptóticos. La concentración más alta de beauvericina ($10 \mu M$) demuestra que lleva a cabo la apoptosis celular mediante el incremento de calcio intracelular, el cual es atribuido a su capacidad ionófora porque la apoptosis celular es más rápida a concentraciones altas. Sin embargo, concentraciones inferiores (desde $5 \mu M$) obtienen un resultado similar de supervivencia celular pero con un tiempo de exposición superior.²⁰

Carcinoma epidermoide

El cáncer de piel es la neoplasia más frecuente en todo el mundo. Se divide en melanoma y no melanoma, en este último entra el carcinoma basocelular y epidermoide. El carcinoma epidermoide ocupa el segundo lugar en México y es capaz de producir metástasis a los ganglios regionales con una mortalidad de 25%. Debido a que este tipo de cáncer es de crecimiento lento se le ha considerado de muy poca importancia, sin embargo, implica un gran factor de riesgo para padecer otros cánceres y recurrencias de acuerdo con el patrón histológico del paciente.³³

Mediante un método colorimétrico, se demostró que la beauvericina inhibe el crecimiento de células de carcinoma epidermoide KB. Se obtuvieron valores de CI_{50} para diferentes beauvericinas isoméricas biosintetizadas en un rango de: 10-20 μ M. Se evaluó además su toxicidad sobre células normales (Vero), una línea celular usada para evaluar los efectos a nivel molecular de toxinas en células de mamíferos, hallando que la beauvericina presentaba una toxicidad para esta línea celular de 4.4-10 μ M; mientras que el control positivo utilizado (elipticina), para esta misma línea celular, fue de 1.0 μ M.²¹

En contraste con los resultados obtenidos mediante el método colorimétrico, en otro bioensayo sobre células de carcinoma epidermoide KB en el que se usó el método MTT modificado, determinaron una CI_{50} de 5.76 \pm 0.55 μ M. Los mecanismos de acción propuestos en este estudio fueron la liberación del citocromo C y la activación de las caspasas 9 y 3.²²

En la Tabla 1 se enlistan las características más importantes de los bioensayos *in vitro* hasta aquí descritos.

Ensayos *in vivo*

Sólo se han reportado dos ensayos *in vivo* de la actividad antitumoral de la beauvericina, empleando modelos murinos. Se utilizaron ratones desnudos de cinco semanas de edad a los cuales se les administró por vía subcutánea células de retinoblastoma Y79 (2 x 10⁶ células), usando como vehículo 200 μ L de solución salina. Para el tratamiento canceroso de retinoblastoma se administró semanalmente una solución 3 μ M de beauvericina alrededor de la zona del tumor durante un periodo de 8 semanas. Los resultados evidenciaron que el peso y tamaño del tumor extraído disminuyó significativamente respecto al grupo control, la ocurrencia del tumor en el grupo control fue del 75 % mientras que en el grupo tratado con beauvericina fue del 20 %, así mismo el peso del tumor de los animales tratados con beauvericina fue de 0.36 g, por lo que disminuyó en un 16 % respecto al grupo control. Esto permitió concluir en dicho

estudio que la beauvericina presenta un efecto antitumoral en modelos *in vivo* en cáncer como retinoblastoma.³⁴ Aunque no se utilizó un control positivo, la administración de la beauvericina vía subcutánea *in vivo* demostró su eficiencia porque tuvo un efecto antiproliferativo de los tumores reduciendo su formación, peso y tamaño considerablemente.

Recientemente se realizó un segundo ensayo *in vivo* utilizando ratones BALB/c y CB-17/SCID de 6 a 8 semanas de edad a los cuales se les administró por vía subcutánea células de carcinoma de colon de un modelo murino CT26 (4 x 10⁵ células) y células humanas de carcinoma cervical KB3-1 (1 x 10⁶ células), respectivamente, utilizando como vehículo medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*). Para el tratamiento de ambos carcinomas se administraron intraperitonealmente 5 mg de beauvericina por kilogramo de peso del roedor diariamente durante dos ciclos, el primer ciclo de 5 días y el segundo de 4 días con dos días entre el primer y segundo ciclo. Los resultados evidenciaron que en ambos casos de carcinoma el peso y tamaño del tumor extraído disminuyó significativamente respecto al grupo control, también se encontraron áreas necróticas y aumento en la fragmentación del ADN dentro de los tumores. Sin embargo, no hubo diferencias en la proliferación celular en secciones tumorales entre los grupos tratados y los grupos control. La administración de beauvericina vía intraperitoneal demostró tener un efecto antitumoral reduciendo el peso y tamaño de los tumores y promoviendo la necrosis tumoral, estos autores proponen que es debido a la inhibición del proceso angiogénico, la liberación del citocromo C y la capacidad ionofora de la beauvericina.³⁵

Mecanismo de acción de la beauvericina

Se han reportado diversos mecanismos que explican la actividad citotóxica de la beauvericina. Entre ellos, destacan la capacidad de modificar las concentraciones iónicas intracelulares y las funciones celulares, así mismo de inducir apoptosis mediante la vía mitocondrial y de MAPK. Sin embargo, los mecanismos exactos por los cuales la apoptosis es inducida son numerosos y aún requieren ser dilucidados con mayor detalle.¹⁸ Se han estudiado cuatro principales mecanismos por los cuales esta micotoxina presenta actividad citotóxica en las diferentes líneas celulares cancerígenas:

- a) La inducción de apoptosis por la vía de las MAP kinasas: MEK 1/2-ERK42/44-90RSK.^{24,25}
- b) La capacidad ionófora de la beauvericina que produce un incremento en la concentración de calcio intracelular.^{23,25,27,36}

c) La participación de proteínas antiapoptóticas y proapoptóticas: Familia Bcl-2.^{19,37-39}

d) Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial, la liberación de Citocromo C y activación de caspasas.^{19,20,22,27}

La inducción de apoptosis por la vía de las MAP kinasas: MEK1/2-ERK42/44-90RSK

Las MAP quinasas (MAPK por sus siglas en inglés, *Mitogen-Activated Protein Kinases*), consisten en un grupo de proteínas quinasas de serina o treonina que fosforilan sustratos para la regulación de la expresión génica, mitosis, proliferación, motilidad, metabolismo y programación de muerte celular.⁴⁰ La vía de las MAPK resulta de la activación de receptores de tirosina quinasa (RTKs por sus siglas en inglés, *Receptor Tyrosine Kinases*) sobre la superficie celular mediante estímulos mitogénicos como factores de crecimiento y citoquinas, produciéndose una dimerización y fosforilación de estos receptores que desencadenan su propia activación. Posteriormente la unión de Ras a GTP en el comienzo de toda la vía de señalización, y culminando con la activación de ERK (ERK por sus siglas en inglés, *Extracellular signal-Regulated Kinases*), el cual es capaz de trasladarse al núcleo para regular la transcripción y actividad de proteínas.^{24,41,42}

Las fallas que se asocian en la regulación de esta vía se encuentran relacionadas con la progresión tumoral, por esta razón en las últimas décadas esta vía ha estado sujeta a investigación con el propósito de identificar los componentes susceptibles de ser utilizados como dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer.⁴¹ La vía de las MAPK se encuentra activa en al menos el 30% de las neoplasias humanas y se han identificado mutaciones en Ras, Braf y RTKs; las mutaciones en Ras se asocia con carcinoma de páncreas (63-90%), colon (36-50%), pulmón (19-30%) y melanoma (15-20%).^{42,43}

Se ha estudiado el efecto que presenta la beauvericina sobre la vía de las MAPK, mediante un estudio *in vitro* en células de hepatoma de rata H4IIE. Se encontró que la beauvericina inhibe la fosforilación de ERK quinasa en sus isoformas (p44/p42) la cual se encuentra asociada con la proliferación celular.²⁵ Así mismo, se sabe que algunos de los sustratos de ERK quinasa son factores de transcripción nucleares y proteínas mitocondriales como Bcl-2.⁴¹ Por lo tanto, la inhibición de ERK es de gran interés para el desarrollo de terapias anticancerígenas que lleven a una disminución de proliferación celular y regulación de proteínas antiapoptóticas, considerando que ERK quinasa se encuentra permanentemente activa en diversos tumores. Beauvericina también activa la fosforilación de JNK (Jun N-terminus

kinases), una subfamilia de MAPK relacionada con la muerte celular, y no muestra algún efecto sobre MAPK p38.²⁵

Así mismo, se evaluó la actividad de beauvericina en 21 proteínas quinasas adicionales, relacionadas con la proliferación celular (ARK5, Aurora A, Aurora B, B-Raf CDK2, CDK4, COT, EGF-R, ErbB2, PDGF-Rb, PLK1, SAK), la angiogénesis (EphB4, Tie2, VEGF-R2), la supervivencia celular (Akt1, CK2, IGF1-R) y metástasis (FAK, Met SRC). Beauvericina mostró una inhibición selectiva sobre SRC quinasa, relacionada con procesos de metástasis.²⁵

Recientemente, Lin y colaboradores confirmaron que la beauvericina induce apoptosis mediante la vía de las MAPK: MEK1/2-ERK42/44-90RSK. Los efectos citotóxicos de la beauvericina se probaron en la línea celular A549 de cáncer pulmonar de células no pequeñas. Para identificar el mecanismo por el cual se inhibe la proliferación celular de A549 mediante la vía de señalización ERK MAPK, se trataron las células con inhibidores selectivos de MEK (U0126) previo al tratamiento con beauvericina; y se observaron cambios morfológicos como disminución de cuerpos apoptóticos, cromatina nuclear, condensación y fragmentación de ADN, así como disminución en la expresión de MAPK: ERK42/44 y 90RSK. Esto indica que el inhibidor de MEK disminuye completamente la actividad citotóxica de la beauvericina y previene que esta micotoxina active la vía MEK-ERK-90RSK, lo cual demuestra una congruente relación entre ambos. Debido a que la activación de RSK (RSK por sus siglas en inglés, Ribosomal s6 Kinase) requiere de un orden en las reacciones de fosforilación mediadas por MEK/1/2-ERK42/44, si MEK está inhibido no es posible que RSK se active como resultado de la cascada de fosforilación. Esto demostró que la beauvericina produce la citotoxicidad en células A549 mediante la vía de MAPK: MEK1/2-ERK42/44 llevando a la activación final de 90RSK.²⁴ Lo anterior es de gran importancia como parte de los mecanismos de acción de la beauvericina, ya que se ha reportado que las funciones de RSKs se encuentran relacionadas con progresión del ciclo celular, proliferación, crecimiento y supervivencia celular, así como de síntesis de proteínas.⁴⁴

Otras subfamilias de MAPK como SPAK/JNK y MAPK p38 también han demostrado su relación con funciones mitocondriales y activación de caspasas en diferentes líneas celulares;²⁴ esto muestra la relación de las MAPK con algunos de los mecanismos de acción, que se describirán posteriormente. La investigación de la actividad que ejerce la beauvericina sobre diferentes tipos de MAPK proporciona una visión sobre los posibles blancos terapéuticos en donde se puede llevar a cabo la actividad anticancerígena de esta micotoxina.

Capacidad ionófora y el aumento del flujo de calcio intracelular

La beauvericina presenta propiedades ionóforas como muchos de los antibióticos que también poseen la estructura de un hexadepsipéptido cíclico. Los ionóforos transfieren iones específicos a través de la membrana celular, utilizando transportadores o canales, dependiendo de su selectividad. Esto conduce a una alteración del contenido iónico y por ende de las funciones celulares produciéndose un efecto citotóxico que induce a la apoptosis.^{45,46}

Se ha demostrado que las propiedades ionóforas de la beauvericina afectan el balance iónico y el pH fisiológico en una gran variedad de células, inhibiendo el metabolismo celular mediante la despolarización de la membrana mitocondrial y la citólisis.⁴⁵ Este tipo de mecanismo que utiliza la beauvericina es semejante al utilizado por muchos agentes desacoplantes mitocondriales como valinomicina y carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, por sus siglas en inglés) los cuales interrumpen la cadena transportadora de electrones incrementando el consumo de oxígeno y produciendo isquemia celular e hipoxia.⁴⁷

Experimentos a nivel celular demuestran que la beauvericina incrementa el flujo del calcio intracelular.^{23,25,27} No obstante, la actividad ionófora de esta micotoxina en membranas de mamíferos también muestra una alta selectividad y habilidad de conducción de cationes monovalentes (Na^+ , K^+) como se ha demostrado en experimentos electrofisiológicos.^{36,45}

El calcio intracelular (Ca^{2+}) es un ion molecular clave que forma parte de diversos tipos de vías de transducción de señales en una gran variedad de células. Es bien conocido que el incremento del calcio intracelular afecta a la secreción celular, división, crecimiento y diferenciación celular, así mismo se encuentra relacionado con la contracción muscular y la internalización de receptores.^{23,48,49} Diversos estudios han reportado la participación del Ca^{2+} en procesos apoptóticos, ya que el aumento de las concentraciones de calcio intracelular produce una disminución del potencial de membrana mitocondrial, liberando al citosol citocromo C, el cual a su vez activa las caspasas (zimógenos que amplifican e integran señales proapoptóticas).^{6,20,50-52} Los mecanismos subyacentes por los cuales la beauvericina incrementa las concentraciones de calcio intracelular pueden ser a partir de la entrada del flujo de Ca^{2+} desde el espacio extracelular o de la liberación de Ca^{2+} desde compartimentos intracelulares como el retículo endoplasmático; sin embargo, estos mecanismos permanecen aún inconclusos por dilucidar.^{23,53}

Participación de la familia Bcl-2 en la inducción de la apoptosis

Muchas sustancias citotóxicas, incluyendo los fármacos anticancerígenos causan la muerte celular mediante la inducción de apoptosis. Existen dos importantes rutas celulares por las cuales se puede llevar a cabo este mecanismo: La vía de receptores de muerte celular y la vía mitocondrial. Esta última depende de la salida del citocromo C desde la mitocondria hacia el citosol.^{19,54} El proceso inicia mediante la interacción de la mitocondria con dos o más grupos de proteínas pertenecientes a la familia Bcl-2, las cuales regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen una clave en la vía intrínseca de la apoptosis celular.⁵⁵ Bcl-2 comprende familias homólogas proapoptóticas y antiapoptóticas, por ejemplo, se ha demostrado que Bcl-2 Y Bcl-XL inhiben la apoptosis, mientras que Bad, Bak y Bax la inducen. Las funciones anti o pro apoptóticas de estas proteínas dependen de la constitución estructural heterodimérica que poseen.^{19,56}

Se ha demostrado en algunas líneas celulares humanas que los niveles en la expresión de Bcl-2 y Bcl-XL se relacionan con la prevención de apoptosis inducida por varios fármacos citotóxicos; por otro lado la sobreexpresión de Bax y Bak producen una sensibilidad a todos los estímulos conocidos de la vía de muerte celular intrínseca.⁵⁷

Estas observaciones sugieren que este tipo de proteínas pueden ser posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos. La actividad citotóxica que presenta la beauvericina se relaciona con estas dianas biológicas. Se ha reportado la regulación de la familia Bcl-2 en células de cáncer pulmonar de células no pequeñas tratadas con beauvericina, resultando en una disminución de la expresión de Bcl-2 y no afectando la expresión de Bad y Bak.¹⁹ Los mecanismos de activación de apoptosis que produce la beauvericina son muy importantes, ya que la familia Bcl-2 se encuentra compuesta por un gran número de genes que participa en el control de la integridad de la membrana mitocondrial y en la reducción del potencial de membrana, lo cual produce la salida de proteínas intermembranales como el citocromo C al citosol y la posterior activación de caspasas, induciendo así a la apoptosis celular.³⁷⁻³⁹

Cambios en el potencial de membrana mitocondrial y activación de caspasas

Como se mencionó anteriormente, la capacidad ionófora de la beauvericina permite la formación de canales selectivos de cationes.^{36,45} La beauvericina, al ser una molécula

ionófora también tiene la capacidad de formar poros en la membrana celular, por ello fue propuesto un modelo que explica la formación de poros a través de esta micotoxina. Se forman complejos de beauvericina tipo “*Sandwich*”, es decir, moléculas de beauvericina apiladas de forma vertical, las cuales facilitan así su entrada a la bicapa lipídica de la membrana celular y el acceso de iones desde cualquier extremo del poro que se va formando por dichos complejos, permitiendo así la difusión de un gradiente electroquímico.^{36,58}

La formación de canales selectivos de cationes y la formación de poros, explican la manera en cómo la beauvericina penetra la membrana celular, produciendo un incremento de Ca^{2+} , el cual posteriormente afecta el potencial de membrana mitocondrial. Aunque no se ha dilucidado un mecanismo específico que explique cuáles vías son activadas específicamente por el incremento de Ca^{2+} para producir la disminución del potencial de membrana mitocondrial, liberación de citocromo C y la activación de caspasas.^{6,19,45} Sin embargo, la disminución que realiza la beauvericina sobre la expresión de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2) y el aumento de aquellas que favorecen la apoptosis (Bak, Bax y p-Bad) permite que se lleve a cabo la regulación de la liberación de citocromo C y la muerte celular mediante la vía mitocondrial.³⁷

El potencial de la membrana mitocondrial es generado por la cadena transportadora de electrones con la reducción de sustratos como NADH y $FADH_2$. En varios ensayos *in vitro* ha sido reportado que la beauvericina induce apoptosis mediante la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, liberando el citocromo C hacia el citosol de la célula.^{19,22,27,45}

Como se mencionó anteriormente, los efectos de la beauvericina son muy parecidos a desacopladores mitocondriales como la valinomicina, por lo que terminan interrumpiendo la cadena transportadora de electrones y por ende perdiendo el potencial de membrana.⁴⁵ En algunos casos, la beauvericina disminuye especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés, *Reactive Oxygen Species*), las cuales se relacionan también con la pérdida del potencial de membrana y la liberación de citocromo C.²²

La apoptosis o muerte celular programada se caracteriza por una serie de cambios morfológicos que incluyen condensación de cromatina, colapso nuclear y formación de cuerpos apoptóticos; estos mecanismos son realizados por proteínas cisteína-dependientes pertenecientes a una familia de enzimas llamadas caspasas. La familia de las caspasas puede ser activada por eventos fisiológicos independientes, tales como, daño al ADN, toxinas y agentes antineoplásicos;

pero también pueden activarse a través de la vía mitocondrial, liberando citocromo C.^{59,60}

Con la salida del citocromo C, comienza la activación de caspasa 9 en presencia de Apaf-1, la cual se encarga de hacer llegar la señal de apoptosis generada por la familia Bcl-2 hasta estas enzimas. La activación de caspasa 9 produce una cadena de reacciones proteolíticas para la activación final de caspasa 3, ésta se adhiere a Poli ADP-ribosa polimerasa como sustrato, la cual se relaciona con procesos de apoptosis.^{20,22}

Por todo lo anterior, la vía mitocondrial es un mecanismo considerado como uno de los ejecutores del proceso de muerte celular.^{61,62} Esta vía involucra: la regulación de la integridad de la membrana mitocondrial por parte de las proteínas Bcl-2, cambios en el potencial de membrana mitocondrial por incremento de Ca^{2+} , la liberación del citocromo C y la activación de caspasas. La beauvericina también utiliza la vía mitocondrial como diana terapéutica para demostrar su actividad anticancerígena.

Conclusiones

La beauvericina exhibe una amplia gama de actividades biológicas interesantes como son: antibiótica, antifúngica, antitumoral y antiviral demostrando su mayor potencial terapéutico como agente anticanceroso. La actividad anticancerígena de esta micotoxina se ha demostrado en diferentes líneas celulares como cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer prostático y de mama metastásico, leucemia y cáncer epidermoide; su citotoxicidad ha sido mayormente selectiva para células cancerosas que para células normales. También ha demostrado inhibir procesos de metástasis y angiogénesis, con una mayor actividad citotóxica que otros compuestos análogos.

Los mecanismos por los cuales la beauvericina ejerce su actividad antitumoral involucra la inhibición de la fosforilación de ERK en la vía de MAPK y activación específica de: MEK1/2-ERK44/42-90RSK, el aumento de Ca^{2+} mediante su capacidad ionófora, así como su participación en la vía mitocondrial mediante la regulación de la integridad de la membrana mitocondrial por parte de las proteínas Bcl-2, cambios en el potencial de membrana mitocondrial, la liberación del citocromo C y la activación de caspasas que inducen a la apoptosis.

La utilización de la beauvericina como agente antitumoral representa una gran área de oportunidades para la investigación farmacéutica ya que aún falta por seguir dilucidando sus mecanismos de acción y demostrar su actividad antitumoral

en más ensayos *in vivo*, e incluso investigar si la beauvericina posee un efecto sinérgico en la coadministración con otros fármacos antitumorales.

Referencias

1. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Nat Prod Rep*. 2007;70(3):461-477.
2. Meyling NV, Eilenberg J. Ecology of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in temperate agroecosystems: Potential for conservation biological control. *Biol Control*. 2007;43:145-155.
3. Hamada Y, Shioiri T. Recent progress of the synthetic studies of biologically active marine cyclic peptides and depsipeptides. *Chem Rev*. 2005;105(12):4441-4482.
4. Sarabia F, Chammaa S, Ruiz AS, Ortiz LM, Herrera FJ. Chemistry and biology of cyclic depsipeptides of medicinal and biological interest. *Curr Med Chem*. 2007;11(10):1309-1332.
5. Xu Y, Orozco R, Wijeratne EM, Gunatilaka AA, Stock SP, Molnár L. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chem Biol*. 2008;15(9):898-907.
6. Wang Q, Xu L. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*. 2012;17(3):2367-2377.
7. Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC. Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. *Braz J Microbiol*. 2008;39(2):301-306.
8. Matthes D, Richter L, Müller J, Denisiuk A, Feifel SC, Xu Y, et al. *In vitro* chemoenzymatic and *in vivo* biocatalytic syntheses of new beauvericin analogues. *Chem Commun (Camb)*. 2012;48(45):5674-5676.
9. Hamill RL, Higgins CE, Boaz ME, Gorman M. The structure of beauvericin, a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. *Tetrahedron Lett*. 1969;49:4255-4258.
10. Grove JF, Pople M. The insecticidal activity of beauvericin and the enniatin complex. *Mycopathologia*. 1980;70(2):103-105.
11. Meca G, Sospedra L, Soriano JM, Ritiene A, Moretti A, Mañes J. Antibacterial effect of the bioactive compound beauvericin produced by *Fusarium proliferatum* on solid medium of wheat. *Toxicon*. 2010;56:349-354.
12. Sivanathan S, Sherkenbek J. Cyclodepsipeptides: A Rich Source of Biologically Active Compounds for Drug Research. *Molecules*. 2014;19:12368-12420.
13. Castlebury LA, Sutherland JB, Tanner LA, Henderson AL, Cerniglia CE. Use of a bioassay to evaluate the toxicity of beauvericin to bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 1999;15:119-121.
14. Wang QX, Li SF, Zhao F, Dai HQ, Bao L, Ding R, Liu HW. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. *Fitoterapia*. 2011;82(5):777-781.
15. Sood S, Sandhu S, Mukherjee TK. Pharmacological and Therapeutic Potential of Beauvericin: A Short Review. *J Proteomics Bioinform*. 2017;10(1):18-23.
16. Zhang L, Yan K, Zhang Y, Huang R, Bian J, Zheng C, et al. High-throughput put synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(11):4606-4611.
17. Shin CG, An DG, Song HH, Lee C. Beauvericin and enniatins H, I and MK1688 are new potent inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. *J Antibiot (Tokyo)*. 2009;62(12):687-690.
18. Ríos RP, González RA, Sánchez CF, Murguía MP. Tendencia de mortalidad por cáncer en México: 1990-2012. *Evid Med Invest Salud*. 2015; 8(1):5-15.
19. Lin H, Lee Y, Chen B, Tsai M, Lu J, Chou C, Jow G. Involvement of Bcl-2 family, cytochrome c and caspase 3 in induction of apoptosis by beauvericin in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett*. 2005;230:248-259.
20. Jow G, Chou C, Chen B, Tsai J. Beauvericin induces cytotoxic effects in human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: The causative role of calcium. *Cancer Lett*. 2004;216:165-173.
21. Nilanonta C, Isaka M, Kittakoop P, Trakulnaleamasai S, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Precursor-directed biosynthesis of beauvericin analogs by the insect pathogenic fungus *Paecilomyces tenuipes* BCC 1614. *Tetrahedron*. 2002;58:3355-3360.
22. Tao YW, Lin YC, She ZG, Lin MT, Chen PX, Zhang JY. Anticancer Activity and Mechanism Investigation of Beauvericin Isolated from Secondary Metabolites of the Mangrove Endophytic Fungi. *Anticancer Agents Med Chem*. 2015;15 (2):258-266.
23. Chen BF, Tsai MC, Jow GM. Induction of calcium influx from extracellular fluid by beauvericin in human leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;340(1):134-139.
24. Lu CL, Lin HI, Chen BF, Jow G-M. Beauvericin-induced cell apoptosis through the mitogen-activated protein kinase pathway in human nonsmall cell lung cancer A549 cells. *J Toxicol Sci*. 2016;41(3):429-437.
25. Wätjen W, Debbab A, Hohlfeld A, Chocou Y, Proksch P. The mycotoxin beauvericin induces apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by an

- inhibition of NF- κ B-activity and modulation of MAP-Kinases. *Toxicol Lett.* 2014;232(1):9-16.
26. Do Nascimento AM, Conti R, Turatti ICC, Cavalcanti BC, Costa-Lotufo L, Pessoa C, Moraes MO, Manfrim V, Toledo JS, Cruz AK, Pupo MT. Bioactive extracts and chemical constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *Rev Bras Farmacogn.* 2012; 22(6):1276-1281.
 27. Zhan J, Burns AM, Liu MX, Faeth SH, Gunatilaka AAL. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *J Nat Prod* 2007;70:227-232
 28. Fenteany G, Zhu S. Small molecule inhibitors of actin dynamics and cell motility. *Curr Top Med Chem.* 2003;3(6):593-616.
 29. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet* 1996;347:1377-1381.
 30. Sánchez OM, Osnaya OM, Rosas BJ. Leucemia linfoblástica aguda. *Med Int Mex.* 2007;23(1):26-33.
 31. Vera MA, Pardo C, Duarte MC, Suárez A. Análisis de la mortalidad por leucemia aguda pediátrica en el Instituto Nacional de Cancerología. *Biomédica.* 2012;32(3):355-364.
 32. Méndez AS, Gutiérrez GI, Vázquez CE. Funcionalidad familiar en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *Aten Fam.* 2015;22(1):7-9.
 33. Güémez GM, Plascencia GA, Graniel LM, Dzul RK. Epidemiología de cáncer de piel en el Centro Dermatológico de Yucatán durante 2012. *Dermatol Rev Mex.* 2015;59(1):9-18.
 34. Cheng C, Chang K, Lee Y. Antiproliferative effect of beauvericin on retoniblastoma. *Fu-Jen J. Med.* 2009;7:167-169.
 35. Heilos D, Rodríguez-Carrasco Y, Englinger B, Timelthaler G, Schoonhoven S, Sulyok M, Boecker S, Süssmuth RD, Heffeter P, Lemmens-Gruber R, Dornetshuber-Fleiss R, Berger W. The Natural Fungal Metabolite Beauvericin Exerts Anticancer Activity In Vivo: A Pre-Clinical Pilot Study. *Toxins.* 2017;9:258.
 36. Kouri K, Lemmens M, Lemmens-Gruber R. Beauvericin induced channels in ventricular myocytes and liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1609:203-210.
 37. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CM, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2 release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997;275:1129-1132.
 38. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96:10964-10967.
 39. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondrial in apoptosis. *Genes Dev.* 1999;13:1899-1911.
 40. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001;410:37-40.
 41. Baraja PC. La ruta RAS-ERK como diana antitumoral. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.* 2009.
 42. Luke JJ, Ott PA, Shapiro GI. The biology and clinical development of mek inhibitors for cancer. *Drugs.* 2014;74:2111-2128.
 43. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012;72(10):2457-2467.
 44. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9: 747-758.
 45. Kouri K, Duchon M, Lemmens R. Effects of beauvericin on the metabolic state and ionic homeostasis of ventricular myocytes of the guinea pig. *Chem Res Toxicol.* 2005;18(11):1661-1668.
 46. Benz R. Alkali ion transport through lipid bilayer membranes mediated by enniatin A and B and beauvericin. *J Membr Biol.* 1978;43:367-94.
 47. Prince RC, Crofts AR, Steinrauf LK. A comparison of beauvericin, enniatin and valinomycin as calcium transporting agents in liposomes and chromatophores. *Biochem Biophys Res Commun.* 1974;59(2):697-703.
 48. Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ. The organization and functions of local Ca(2+) signals. *J Cell Sci.* 2001;:2213-22.
 49. Berridge MJ, Bootman MD, Lipp P. Calcium, a life and death signal. *Nature.* 1998;395(6703):645-648.
 50. Tang CY, Chen YW, Jow GM, Chou C J, Jeng CJ. Beauvericin activates Ca2+-activated Cl- currents and induces cell death in *Xenopus oocytes* via influx of extracellular Ca2+. *Chem Res Toxicol.* 2005;18:825-33
 51. Brini M, Carafoli E, Cell. Calcium signalling: a historical account, recent developments and future perspectives. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57:354-70.
 52. Nicotera P, Orrenius S, The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium.* 1998;23:173-180.
 53. Prosperini A, Meca G, Font G, Ruiz MJ. Study of the cytotoxic activity of beauvericin and fusaproliferin and bioavailability *in vitro* on Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(7):2356-2361.
 54. Kaufmann SH, Earnshwa WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* 2000;256:42-49.
 55. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281:1322-1326.
 56. McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss MM, Andersen P. Lo, Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation, *Experientia.* 1996;52: 1008-1017.

57. Schmitt E, Sane AT, Steyaert A, Cimoli G, Bertrand R. The Bcl-XL and Bax-alpha control points: modulation of apoptosis induced by cancer chemotherapy and relation to TPCK-sensitive protease and caspase activation. *Biochem. Cell Biol.* 1997;75:301-314.
58. Ivanov TV, Evstratov AV, Sumskaya LV, Melnik EI, Chumburidze TS, Portnova SL, Balashova TA, Ovchinnikov Yu A. Sandwich complexes as a functional form of the enniatin ionophores. *FEBS Letters.* 1973;36(1):65-71.
59. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
60. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 1999;68:383-424.
61. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326:1-16.
62. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell.* 1999;96(2):245-254.