



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE  
CIENCIAS DE LA VIDA Y LA NATURALEZA  
(ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA**

**BIOPROSPECCIÓN DE HONGOS DEL PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU  
(BRASIL) CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

**JESSICA ROSMARY ROMERO MACHADO**

Foz do Iguaçu  
2021

**BIOPROSPECCIÓN DE HONGOS DEL PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU  
(BRASIL) CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

**JESSICA ROSMARY ROMERO MACHADO**

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial a la obtención del título de grado en Biotecnología.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz

Foz do Iguaçu  
2021

JESSICA ROSMARY ROMERO MACHADO

**BIOPROSPECCIÓN DE HONGOS DEL PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU  
(BRASIL) CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL**

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, como requisito parcial a la obtención del título de grado en Biotecnología.

**BANCA EXAMINADORA**



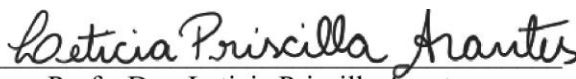
---

Orientadora: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos  
UNILA



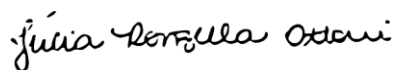
---

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz  
UNILA



---

Profa. Dra. Leticia Priscilla Arantes  
UNILA



---

Profa. Dra. Júlia Ronzella Ottoni  
UNILA

Foz do Iguaçu, 11 de junio de 2021.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor (a): Jessica Rosmary Romero Machado

Curso: Biotecnología

	Tipo de Documento
(...x..) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(...x...) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: BIOPROSPECCIÓN DE HONGOS DEL PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU (BRASIL) CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL

Nome do orientador (a): Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Nome do Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz

Data da Defesa: 11 / 06 / 2021

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

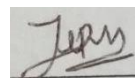
a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, 08 de julho de 2021.



Assinatura do Responsável

Dedico este trabajo a mis abuelos, hermano espiritual (Guido) y tío Bernardino Villar (segundo papá), que desde el cielo son las estrellas que guían mis pasos en este universo.

## AGRADECIMENTOS

Quiero agradecer a Dios por ser mi guía, por brindarme fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad, otorgándome paciencia, sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas.

Me gustaría hacer un agradecimiento especial a mi orientadora, la profesora Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos que me dio la oportunidad de iniciar al mundo científico, permitiendo que realice mi proyecto de Iniciación científica con ella, me brindo las herramientas y los conocimientos necesarios para superar cada obstáculo que surgió durante el camino, gracias por orientarme durante este largo y cansativo proceso que conlleva realizar una tesis, por su paciencia y su buena predisposición en todo momento.

A mi co-orientador el profesor Dr. Jorge Luis María Ruiz con quien trabajé durante gran parte de mi iniciación científica, por su paciencia, guía, tiempo y enseñanzas brindadas, sin su ayuda no hubiera sido posible la culminación de ambos proyectos. Gracias profesor.

Agradezco a todos mis profesores de UNILA y a los que en algún momento formaron parte de mi educación, que de alguna u otra forma otorgaron conocimientos para hacerme una mejor profesional y persona; principalmente a la profesora Dra. Carla Vermeulen Carvalho Grade, que siempre supo escucharme, brindarme su apoyo y darme ánimos para seguir adelante, a la profesora Dra. Thatiana Corrêa De Melo quien siempre transmite su amor por la ciencia de una manera que te inspira para seguir adelante.

A mis padres Emigdia Machado y Maximo Romero por su amor y apoyo, que a pesar de todas mis fallas siempre estuvieron allí para darme una palabra de aliento, a mis primos/hermanos Alexis Villar, Marcelo Villar, Moisés Villar y Joel Augusto por malcriarme y animarme siempre, a mi tía Francisca Machado, Mariajuana García, gracias por sus palabras y cariño.

Especial agradecimiento a mi compañero de graduación Luis Alberto Beltrán Mármol, quien se convirtió en mi mejor amigo y hermano, gracias por apoyarme emocionalmente, escucharme, regañarme, darme consejos cuando sentía que ya no podía, agradezco infinitamente que hayas confiado en mí.

A mis compañeros y amigos, María Camila, Tania Cáceres, Juliette Estigarribia, Bruno González, James Jean-Baptiste, Diego Cadena, Albeiro Cadena y a todos

los demás por siempre estar ahí dando su apoyo, su hombro, su oído, gracias chicos de corazón.

Y por último pero la más importante, agradezco a mí misma por no permitirme rendir nunca, por soportar y seguir adelante a pesar de no tener fuerzas ni ganas de seguir, uno se da cuenta de lo capaz y fuerte que es en sus peores momentos, por eso se convirtió en mi lema esta frase Confía en ti mismo y todo será posible, Amate y todo será distinto, un día terrible no es una vida terrible, tú lo eliges.

Agradezco al DELABEN, quienes brindaron durante mi iniciación científica los materiales que en ocasiones necesitábamos, a la UNILA por brindarme esta oportunidad de ser Biotecnologista, por darme una educación de calidad y con profesores siempre atentos a resolver dudas. Gracias, che aguije peẽme ãuarã.

*La vida no es fácil,  
para ninguno de nosotros.  
Pero... ¡Que importa!  
Hay que perseverar y,  
sobre todo, tener  
confianza en uno mismo.  
Hay que sentirse dotado  
para realizar alguna cosa  
y que esa cosa hay que alcanzarla,  
cueste lo que cueste.  
**Marie Curie - Polonia***



ROMERO MACHADO, Jessica Rosmary **Bioprospecção de Fungos do Parque Nacional do Iguaçu (Brasil) com Atividade Antitumoral**. 2021. 47. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

## RESUMO

O presente trabalho estudou a biodiversidade fúngica do PNI selecionando fungos isolados do solo do Parque Nacional do Iguaçu com potencial para a produção de compostos antitumorais para aplicações na área de oncologia. No estudo, foram utilizadas linhagens tumorais derivadas de tumores pancreáticos sólidos, utilizando células MiaPaca-2, nas quais foram realizados testes de proliferação celular para determinar a diminuição da viabilidade celular, utilizando o ensaio de proliferação celular MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo) em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Os fungos conservados na Coleção de Culturas de Microrganismos de Importância Biotecnológica e Ambiental (CCMIBA) foram cultivados em meio líquido de malte 2% e os extratos obtidos após o cultivo foram adicionados às culturas de células. A viabilidade celular foi determinada pela quantificação da absorbância em 492 nm e 630 nm em espectrofotômetro expressa como porcentagem da viabilidade celular. Os resultados mostraram extratos fúngicos capazes de inibir o crescimento celular, porém, também extratos fúngicos que aumentaram a proliferação celular, por meio do teste de MTT foi obtido o valor de IC<sub>50</sub> para os fungos: *Fusarium* sp. MD, *Fusarium* sp. BF, *Fusarium* sp. IT, *Cladosporium* sp. EB, *Trichoderma* sp. KQ, e para fungos taxonomicamente não identificados: IL, CH, PK, CX e CE. Novos estudos estão sendo realizados pelo grupo para a caracterização taxonômica do mesmo sendo de extrema importância para a continuidade dos estudos. Os fungos estudados, além de possuírem potencial para tratamento tumoral, podem ser utilizados no ambiente clínico para encontrar biomarcadores, alvos terapêuticos em protocolos de laboratório e métodos de detecção precoce por meio da atividade de aumento da proliferação celular.

**Palavras-chave:** Bioprospecção. Citotoxicidade. Anticâncer. Ascomicetos. Biomarcadores.

ROMERO-MACHADO, Jessica Rosmary. **Bioprospecting of Fungi from the Iguazu National Park (Brazil) with Antitumor Activity**. 2021. 47. Trabajo de Conclusión de Curso II (Biotecnología) – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguazu, 2021.

### ABSTRACT

The present work studied the fungal biodiversity of the PNI selecting fungi isolated from the soil of the Iguazu National Park with potential for the production of antitumor compounds for applications in the field of oncology. In the study, tumor lines derived from solid pancreatic tumors were used, using MiaPaca-2 cells, in which cell proliferation tests were performed in order to determine the decrease in cell viability, using the MTT cell proliferation assay (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM). The fungi conserved in the Collection of Culture of Microorganisms of Biotechnological and Environmental Importance (CCMIBA) were cultivated in 2% Malt liquid medium and the extracts obtained after cultivation were added to cell cultures. Cell viability was determined by quantifying the absorbance at 492 nm and 630 nm in a spectrophotometer expressed as a percentage of cell viability. The results showed fungal extracts capable of inhibiting cell growth, however, also fungal extracts that increased cell proliferation, by means of the MTT test the IC<sub>50</sub> value was obtained for the fungi: *Fusarium* sp. MD, *Fusarium* sp. BF, *Fusarium* sp. IT, *Cladosporium* sp. EB, *Trichoderma* sp. KQ, and for taxonomically unidentified fungi: IL, CH, PK, CX and CE. New studies are being carried out by the group for the taxonomic characterization of the same being of great importance for the continuity of the studies. The fungi studied, in addition to having the potential for tumor treatment, can be used in the clinical setting to find biomarkers, therapeutic targets in laboratory protocols and early detection methods through the activity of increasing cell proliferation.

**Keywords:** Bioprospecting. Cytotoxicity. Anticancer. Ascomycota. Biomarkers.

ROMERO MACHADO, Jessica Rosmary **Bioprospección de Hongos del Parque Nacional do Iguaçu (Brasil) con Actividad Antitumoral**. 2021. 47. Trabajo de Conclusión de Carrera II (Biotecnología) – Universidad Federal de Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2021.

## RESUMEN

El presente trabajo estudió la biodiversidad fúngica del PNI seleccionando hongos aislados del suelo del Parque Nacional do Iguaçu con potencial para producción de compuestos antitumorales para aplicaciones en el campo de la oncología. En el estudio, se utilizaron líneas tumorales derivadas de tumores sólidos de páncreas, empleando células MiaPaca-2, en las que fueron realizadas pruebas de proliferación celular con el fin de determinar la disminución de la viabilidad celular, usando el ensayo de proliferación celular MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Los hongos conservados en la Colección de Cultura de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental (CCMIBA) se cultivaron en medio líquido de Malta al 2% y los extractos obtenidos después del cultivo, se agregaron a cultivos celulares. La viabilidad celular se determinó cuantificando la absorbancia a 492 nm y 630 nm en espectrofotómetro expresados en porcentaje de viabilidad celular. Los resultados mostraron extractos fúngicos capaces de inhibir el crecimiento celular, sin embargo, también extractos fúngicos que aumentaron la proliferación celular, mediante el ensayo de MTT se obtuvo el valor de IC<sub>50</sub> para los hongos: *Fusarium* sp. MD, *Fusarium* sp. BF, *Fusarium* sp. IT, *Cladosporium* sp. EB, *Trichoderma* sp. KQ, y para los hongos taxonómicamente no identificados: IL, CH, PK, CX y CE. Nuevos estudios están siendo realizados por el grupo para la caracterización taxonómica de los mismos siendo de suma importancia para la continuidad de los estudios. Los hongos estudiados, además de tener potencial para tratamiento tumoral pueden ser utilizados en el ámbito clínico para encontrar biomarcadores, blancos terapéuticos en protocolos de laboratorios y métodos de detección precoz mediante la actividad de aumento de la proliferación celular.

**Palabras clave:** Bioprospección. Citotoxicidad. Anticancerígeno. Ascomicetos. Biomarcadores.

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1-</b> EL MAPA MUESTRA EL PRINCIPAL NÚMERO DE CASOS DE CÁNCER, SE PUEDE OBSERVAR AL COSTADO IZQUIERDO LOS NÚMEROS, SE DIVIDE POR COLORES DE ACUERDO AL PREDOMINIO EN CADA PAÍS. ....	19
<b>GRÁFICO 2-</b> MUESTRA EL NÚMERO DE CASOS NUEVOS EN TODO EL MUNDO EN 2020, EN AMBOS SEXOS Y TODAS LAS EDADES, SE DIVIDE POR COLORES DE ACUERDO AL PREDOMINIO DEL TIPO DE CÁNCER CON MAYOR INCIDENCIA. ....	20
<b>GRÁFICO 3-</b> MUESTRA EL NÚMERO DE MUERTES DURANTE 2020, EN TODO EL MUNDO DE AMBOS SEXOS, SE DIVIDE POR COLORES DE ACUERDO AL PREDOMINIO DEL TIPO DE CÁNCER CON MAYORES CASOS DE MORTALIDAD. ....	20
<b>GRÁFICO 4-</b> MUESTRA EL NÚMERO DE CASOS EN BRASIL DURANTE EL 2020, DE AMBOS SEXOS Y TODAS LAS EDADES, SE DIVIDE POR COLORES DE ACUERDO AL PREDOMINIO DEL TIPO DE CÁNCER CON MAYOR INCIDENCIA DURANTE EL AÑO.....	21
<b>GRÁFICO 5-</b> VIABILIDAD CELULAR VS CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO FÚNGICO TENIENDO EN CUENTA LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA DEL 50% (IC <sub>50</sub> ). ....	32
<b>GRÁFICO 6-</b> VALORES DEL IC <sub>50</sub> DE LOS EXTRACTOS FÚNGICOS. ....	32
<b>GRÁFICO 7-</b> VIABILIDAD CELULAR VS CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO FÚNGICO TENIENDO EN CUENTA LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA DEL 50% (IC <sub>50</sub> ).....	34

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1-</b> ESTRUCTURA DE LA OFIOSETINA (1), EQUISETINA (2) Y PAECILOSETINA (3).....	16
<b>FIGURA 2-</b> FOTOGRAFÍA AÉREA DE LAS CATARATAS LOCALIZADAS EN EL PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU.....	17
<b>FIGURA 3-</b> FOTOGRAFÍA DE LOS HONGOS AL SER CULTIVADOS EN EL ERLNMEYER.....	26
<b>FIGURA 4-</b> FOTOGRAFÍA DE LOS HONGOS CULTIVADOS EN EL ERLNMEYER.....	26
<b>FIGURA 5-</b> ESTRUCTURA DEL MTT Y SU PRODUCTO EL FORMAZÁN.....	28
<b>FIGURA 6-</b> ENSAYO DE MTT. PLACA DE 96 POZOS, CON Y SIN EXTRACTO DE HONGOS, LÍNEA CELULAR DE CÁNCER DE PÁNCREAS (MIAPACA-2).....	30

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 1-</b> PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES DE LOS EXTRACTOS FÚNGICOS. ....	29
<b>TABLA 2-</b> VALORES OBTENIDOS DE IC <sub>50</sub> PARA LOS EXTRACTOS DE HONGOS QUE INHIBIERON EL CRECIMIENTO CELULAR DE MIAPACA-2. ....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

Células A549	Células de cáncer de pulmón.
Células CD-1	Sarcoma de ratón.
Células Hela	Células de carcinoma de cuello uterino humano
Células Hep-G2	Hepatoceular líneas celulares de carcinoma
Células Miapaca-2	Líneas tumorales derivadas de tumores sólidos de páncreas
Células MCF-7	Celulas de carcinoma de mama
Células MDA-MB-231	Células de carcinoma de mama
Células K562	Células leucémica mieloide crónica
Células P388	Células leucémica murina.
Células SGC-7901	Células de cáncer gástrico
CCMIBA	Colección de Cultura de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DMEN	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfoxido
IARC	Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer.
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria del 50%.
ICMBIO	Instituto Chico Mendes para la conservación de Brasil.
ILACVN	Instituto Latino-Americano de Ciencias de Vida y de la Naturaleza
INCA	Instituto Nacional de Cáncer
MA <sub>2</sub>	Malta al 2%
MTT	(Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)
NP	Napopartículas de Oro.
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón fosfato salino
PI	Yoduro de Propidio
PNI	Parque Nacional do Iguaçu
TC	Tomografía computarizada.
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
UNILA	Universidad Federal da Integración Latino-Americana

## Sumario

<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>
<b>2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>14</b>
2.1 BIODIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.....	14
2.1.1 Biodiversidad del Parque Nacional do Iguaçu .....	17
2.2 CÁNCER: COMPUESTOS ANTITUMORALES Y DIAGNÓSTICO.....	19
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
3.1 GENERAL: .....	24
3.2 ESPECÍFICOS: .....	24
<b>4 METODOLOGÍA</b> .....	<b>25</b>
4.1 MICROORGANISMOS TESTADOS.....	25
4.1.2 Cultivo de hongos y preparo de los extractos.....	25
.....	26
4.1.3 Cultivos de células tumorales .....	26
4.1.4 Viabilidad celular con extractos de hongos .....	28
4.1.5 Análisis estadístico .....	30
<b>5 RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	<b>31</b>
<b>6 CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>40</b>



## 1 INTRODUCCIÓN

A pesar del intenso estudio llevado a cabo en los últimos años con el objetivo de inventariar microorganismos, principalmente de ambientes extremos y marinos, focalizando en aplicaciones biotecnológicas, el conocimiento de la diversidad microbiana encontrada en muchos hábitats terrestres es aún limitada. Un ejemplo es la región del Parque Nacional do Iguaçu (PNI) Brasil, que posee sus entornos prácticamente inexplorados. El PNI, ubicado en el Estado de Paraná, a 17 km del centro de la ciudad de Foz do Iguaçu, es una Unidad de Conservación de Brasil, administrada por el Instituto Chico Mendes para la Conservación de la Biodiversidad (ICMBio). Según el Mapa de Suelos de Brasil los suelos del tipo de nitosol, como los del PNI, en Brasil están restringidos a algunas regiones del sur y del norte, en consecuencia, el conocimiento de la microbiota asociada con este tipo de suelo no se informa ampliamente, lo que indica una brecha de biodiversidad y condiciones que pueden proporcionar ventajas biotecnológicas en relación con los microorganismos ya descritos (SANTOS *et al.*, 2011).

Las aplicaciones de la biotecnología en la oncología aglutinan, en particular, la investigación para el diagnóstico del cáncer y el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento del mismo. Se le define al cáncer como un conjunto de enfermedades similares, que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, con tasas anormales de división celular, crecimiento y diseminación a cualquier parte del cuerpo (CANCERQUEST, 2021).

En diciembre de 2020 la IARC publicó el GLOBOCAN 2020 actualizado con las nuevas estimaciones indicando que se produjeron 19,3 millones de nuevos casos de cáncer (18,1 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma) y casi 10,0 millones de muertes por cáncer (9,9 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma) (SUNG *et al.*, 2021) lo que demuestra la necesidad de acelerar nuevas investigaciones tratando de hallar fármacos o tratamientos que mejoren el diagnóstico o el tratamiento del cáncer (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020).

Los antitumorales son compuestos que actúan sobre las células tumorales, induciendo su muerte o restringiendo su proliferación. La mayoría son de origen natural, gran cantidad de estos fármacos proviene de organismos terrestres o marinos, y poseen actividad antitumoral intrínseca, causando efectos secundarios nocivos en los pacientes. Debido a esta toxicidad las investigaciones por compuestos antitumorales han aumentado buscando encontrar agentes que causen menos efectos secundarios (FERRAZ *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2001; XUE *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2000).

Por lo tanto, este trabajo estudió la biodiversidad fúngica del PNI seleccionando hongos aislados del suelo del Parque Nacional do Iguaçu para detectar aquellos con actividades antitumorales, potencial para aplicaciones en el campo de la oncología.

## 2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BIODIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

El principal pilar de la vida en la tierra son los microorganismos, por miles de millones de años se desarrollaron en todos los nichos del planeta, modificando los océanos, la atmosfera, estableciendo un lugar con condiciones propicias para los organismos multicelulares. Recién en la última década se empezó a profundizar el estudio de las comunidades microbianas, descubriendo muchas formas de comportamiento del ecosistema microbiano. Si se extinguieran los microorganismos toda la vida en la tierra moriría, eso demuestra la gran importancia que poseen. En los últimos tiempos el cambio climático ha causado varios cambios en los polos lo que podría remodelar la estructura de toda la biosfera afectando la estabilidad de las diversidades microbianas y por ende a la sociedad (GIBBONS *et al.*, 2015).

Los microorganismos son capaces de llevar a cabo una gran cantidad de reacciones metabólicas, aprovechando desde la luz solar hasta el carbono orgánico y varios minerales inorgánicos como recurso energético, siendo capaces de adaptarse a distintas condiciones fisicoquímicas incluidos ambientes extremos, una estrategia de los microorganismos para evolucionar en comunidad y sobrevivir es la adherencia a superficies, lo que permite que logren hacer frentes a los diversos factores abióticos que los rodean y que pueden ser estresantes (PRIETO *et al.*, 2018). Además de ser competentes en la producción y utilización de innumerables metabolitos lo que posibilita a los microbios alimentarse y formar nichos específicos (GIBBONS *et al.*, 2015).

Desde el punto de vista científico, la diversidad microbiana es definida como una cantidad de variaciones que se encuentran en las diferencias genéticas, morfológicas y funcionales de las poblaciones que se hallan en un determinado espacio. Generalmente se utiliza diferentes medidas para caracterizar comunidades microbianas en una determinada muestra y la base son número (riqueza), equitabilidad de distribución e identidad de diferentes especies (GENTRY *et al.*, 2015).

La diversidad microbiana es medida mediante varios métodos, lo que dificulta la comprensión de este número. El valor estimado de la diversidad bacteriana (basadas en secuencias de rRNA 16S) en los suelos de bosques tropicales es de 8772 especies

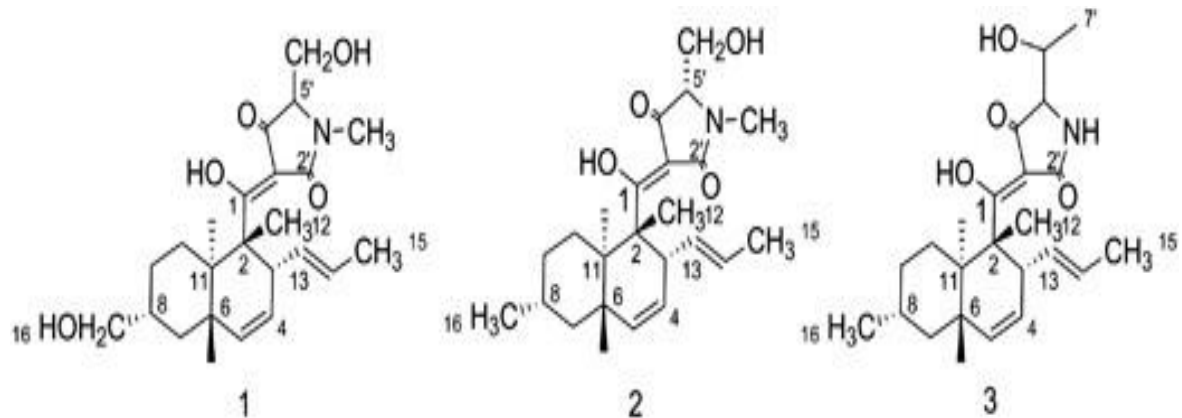
(riqueza en especies) (FIERER *et al.*, 2012). Mientras que la diversidad fúngica ha sido estudiada ampliamente en los últimos tiempos, logrando se estimar el número de especies. Un estudio independiente, dependiente del cultivo en las mismas muestras, revelo que las especies de hongos en la tierra eran de 12 (de 11,7 a 13,2) millones comparado con 2,2 a 3,8 millones de especies cuando calculado mediante diversas técnicas de estimación. Sin embargo, se especula que si se utiliza las técnicas actuales de secuenciamiento de alto rendimiento se revelara un número mayor de diversidad que la conocida actualmente (WU *et al.*, 2019).

Los microbios pueden alterar sus entornos, llegando a poder diseñar el planeta y nuestra salud. El conocimiento actual que poseemos es reducido generalmente porque las interacciones microbianas son complejas o difíciles de estudiar, esto demuestra la necesidad de una rápida adquisición de conocimientos acerca de los mecanismos metabólicos y procesos evolutivos sobre los ecosistemas microbianos (BENGTSSON-PALME, 2020; GIBBONS *et al.*, 2015).

Esto ha iniciado cambios en la manera que se práctica la medicina, adoptando enfoques biológicas para diagnosticar y tratar condiciones de enfermedades complejas. Al igual que los procesos industriales que en algún momento se basaron en la biotecnología derivada de un solo organismo, ahora examinan posibles maneras de estandarizar interacciones del metabolismo dentro de comunidades complejas con el fin de producir transformaciones bioquímicas. Como ejemplo, la agricultura ha empezado a utilizar análisis molecular, biología de sistemas y modelos microbianos para tratar de mejorar la productividad del cultivo, suprimir enfermedades y la tolerancia al estrés (BENGTSSON-PALME, 2020; GIBBONS *et al.*, 2015).

En una de las investigaciones sobre las comunidades microbianas se aisló del suelo de las aguas termales de Japón, un hongo micopatógeno llamado *Elaphocordyceps ophioglossoides*. Este presentó dos compuestos que indicaban la presencia de ácido tetrámico, la equisetina y un nuevo derivado de equisetina denominado ofiofetina, que mostro una pequeña actividad antimicrobiana y anticancerígena comparativamente con otros análogos (paecilocetina) relacionados a la equisetina, estructuras que se pueden observar en la Figura 1 (PUTRI *et al.*, 2010). La paecilosetina análoga de la equisetina, junto con una N-hidroxipiridona la farinosone fueron aislados del hongo *Paecilomyces farinosus* y muestran varias actividades biológicas, como la citotoxicidad contra líneas de células tumorales tipo P388 (línea celular leucémica murina) (LANG *et al.*, 2005).

**Figura 1-** Estructura de la ofiofetina (1), equisetina (2) y paecilofetina (3).



Fuente: (PUTRI *et al.*, 2010).

Los hongos pueden ser descomponedores, mutualistas y hasta patógenos, jugando un papel importante en los ecosistemas, sin embargo no se conoce con exactitud el papel individual de cada hongo. Con el aumento de enfermedades causadas por los hongos tanto virulentas como infecciosas ha llevado consigo al aumento de investigaciones sobre los mismos, pues han causado varias muertes y hasta extinciones en especies silvestres, convirtiéndose en una amenaza en la seguridad alimentaria tanto para las especies silvestres como humanas, siendo que no en algunos casos no se dispone la descripción de varios de los hongos patógenos causantes de algunos desastres (WU *et al.*, 2019).

Existen varios estudios que demuestran que los hongos tienen actividad antimicrobiana y hasta informes sobre los hongos endófitos, como ejemplo se puede citar el aislamiento de los compuestos 6-O-metilalaternina y alter-solanol A, obtenidos del hongo endófito *Ampelomyces* sp., aislado de la planta medicinal *Urospermum picroides* (Asteraceae). Estos compuestos presentaron actividades antimicrobianas contra los patógenos Gram positivos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Enterococcus faecalis* (PINHEIRO *et al.*, 2017).

Además, en otra investigación realizada también con las plantas farmacéuticas *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* y *Torreya grandis*, fueron aislados hongos endófitos con actividades antifúngicas y antitumorales, siendo ellas de los géneros *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp. y *Paecilomyces* sp. respectivamente, demostrando que los hongos pueden ser una fuente esperanzadora de bioactivos antitumorales y antifúngicas (HUANG *et al.*, 2001).

Las aplicaciones biotecnológicas de los estudios de las biodiversidades de microorganismos presentan gran potencial para la resolución de problemas ambientales y de

la salud humana (PRIETO *et al.*, 2018). La bioprospección genera productos para el área farmacéutica, biotecnológica, agronómica, médica y diversas otras áreas, por lo tanto, se define como una búsqueda de componentes naturales y organismos de la biodiversidad, para generar productos comerciales. Es considerada un área interesante para realizar análisis tanto industriales como para el área académico o científica, ya que en esta confluye una serie heterogénea de intereses y motivaciones para su estudio (TORRES *et al.*, 2009).

### 2.1.1 Biodiversidad del Parque Nacional do Iguazu

El PNI, observado en la Figura 2, fue creado el 10 de enero de 1939 por el Decreto-Ley n° 1.035 y catalogado por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO) como Patrimonio de la Humanidad en 1986. Bajo los criterios III e IV del documento es mencionado que poseen una de las cascadas más grandes de la humanidad compartida con Argentina y es el lugar donde se encuentra varias especies de flora y fauna raras, así como es el hogar de muchas especies en peligro de extinción, como la nutria gigante y el oso hormiguero (UNESCO, 1986a, 1986b; WORLD HERITAGE COMMITTEE, 1985a, 1985b). Es la última muestra del dominio del bosque atlántico, posee 185.262 hectáreas y un perímetro de aproximadamente 420 km (SALAMUNI *et al.*, 2002).

**Figura 2-** Fotografía aérea de las cataratas localizadas en el Parque Nacional do Iguazu.



Fuente: Visit iguassu disponible en: sitio <https://es.iguassu.com.br/cataratas-del-iguazu/brasil/parque-nacional-del-iguazu/>

Está situado en la parte suroeste de Estado de Paraná prácticamente entre los paralelos de 25°05' y 25°40' de latitud sur y los meridianos de 54°30' y 54°40' de longitud oeste. Esta es una región cuya temperatura máxima es alrededor de 40°C y el mínimo alrededor de 3°C, el clima es lluvioso, sin estaciones secas definidas, y hasta 80% de humedad relativa del aire. Su área presenta dos dominios geotécnicos que pueden ser caracterizados como dominio efusivo de áreas volcánicas y dominio de la cubierta reciente, que tienen diferentes respuestas ambientales, debido a características litológicas, texturales y estructurales que cada uno posee (SALAMUNI *et al.*, 2002).

Las investigaciones sobre diversidad morfológica y funcional de hongos del PNI son prácticamente inexistentes, siendo necesaria la exploración para encontrar potenciales biotecnológicos. Un estudio de revisión listó los hongos hallados en el Parque Nacional Iguazú de Argentina con la finalidad de formar una base taxonómica, consiguieron listar un total de 330 taxones específicos e infraespecíficos, y describieron que la mayoría pertenecen a especies de *Stereales* (67), *Hymenochaetaceae* (43), *Poriales* (68) y *Agaricales* s. l (90), de los cuales *Tricholomataceae* comprende 61 taxones. También encontraron que algunos de los grupos son extremadamente subrepresentados debido a la falta de estudios adecuados, como la *Ascomycota* en su conjunto (con solo 35 taxa), los *Phragmobasidiomycetes* (con 16), los *Clavariaceae* s. l con un escaso 3, la *Myxomycota* (con solo 4), y los *Lycoperdales* (también con 8). Los propios autores mencionan la falta de estudios sobre los microhongos y que no existe una lista registrada sobre fitomicetos (WRIGHT *et al.*, 2005).

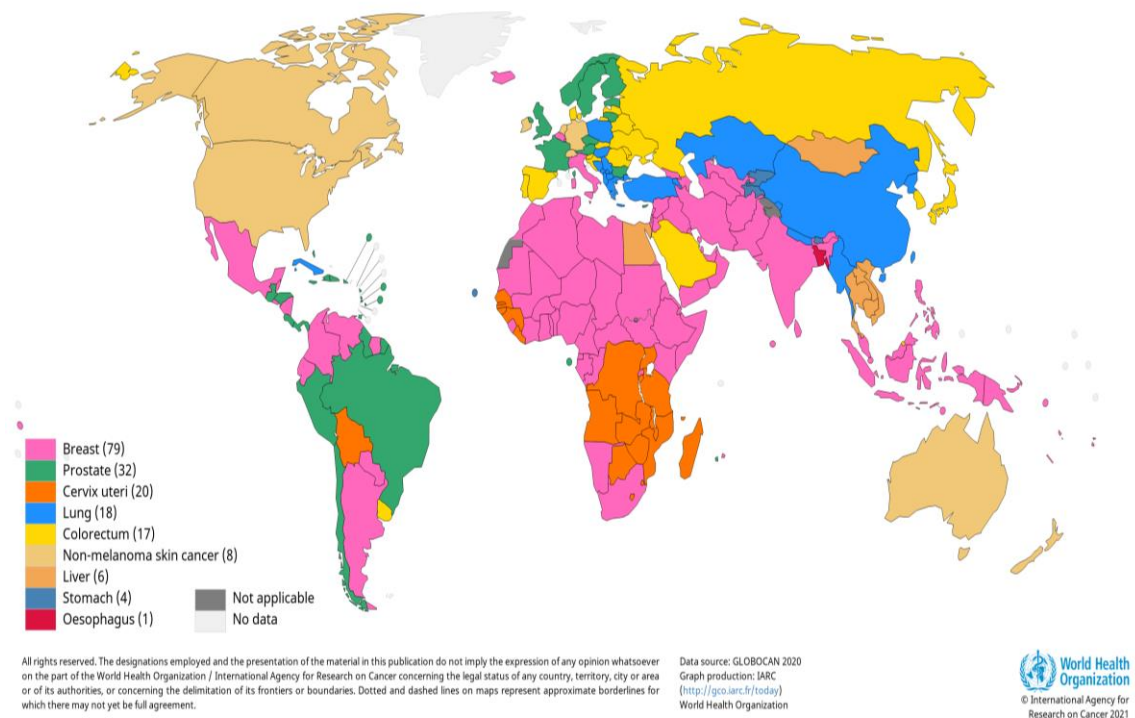
En un estudio realizado sobre el efecto del borde en hongos del PNI fueron aislados y preservados 366 morfotipos, de los cuales 55,6% están presentes en el interior del bosque, 39,1% en el borde y 5,4% presentes tanto en el interior como en el borde, y 316 hongos no pudieron ser identificados por no presentar estructuras de identificación microscópica. Utilizaron caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos con lo cual pudieron identificar 46 morfotipos a nivel de género *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* y *Neurospora*, tres fueron identificadas a nivel de familia Sclerotiniaceae y una a nivel de división Zygomycota. Además pudieron identificar 69 morfotipos de hongos en el mismo estudio con potencial ligninolítico, de los cuales fue hallada una especie de *Trichoderma* y una especie de *Fusarium*, siendo el resto no identificados (DUQUE CASTAÑO, 2016).

## 2.2 CÁNCER: COMPUESTOS ANTITUMORALES Y DIAGNÓSTICO

En 2018 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha publicado, mediante su agencia GLOBOCAN, las estimaciones sobre la carga epidemiológica mundial de cáncer siendo que en 2018, hubo 9,6 millones de muertes por cáncer y el número de nuevos casos había aumentado en 18,1 millones, según un comunicado emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (IARC, 2019). Sin embargo, en diciembre de 2020, la IARC publicó el GLOBOCAN 2020 actualizado con las nuevas estimaciones indicando que se produjeron 19,3 millones de nuevos casos de cáncer (18,1 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma) y casi 10,0 millones de muertes por cáncer (9,9 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma) (SUNG *et al.*, 2021). Lo que demuestra el gran aumento en los últimos 2 años de la incidencia de casos producidos por cáncer y la necesidad de acelerar nuevas investigaciones tratando de hallar fármacos o tratamientos que mejoren al mismo.

Se puede observar en el Gráfico 1 el número de cáncer por país, en el Gráfico 2 el aumento de número de incidencia del cáncer en todo el mundo y en el Grafico 3 el número de mortalidad a causa del cáncer en todo el mundo.

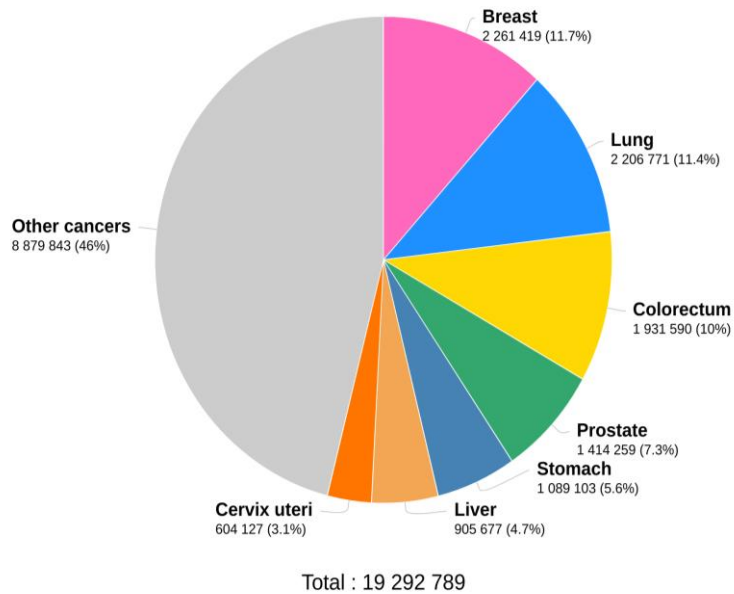
**Gráfico 1-** El mapa muestra el principal número de casos de cáncer, se puede observar al costado izquierdo los números, se divide por colores de acuerdo al predominio en cada país.



Fuente: (IARC, 2020).



**Gráfico 2-** Muestra el número de casos nuevos en todo el mundo en 2020, en ambos sexos y todas las edades, se divide por colores de acuerdo al predominio del tipo de cáncer con mayor incidencia.

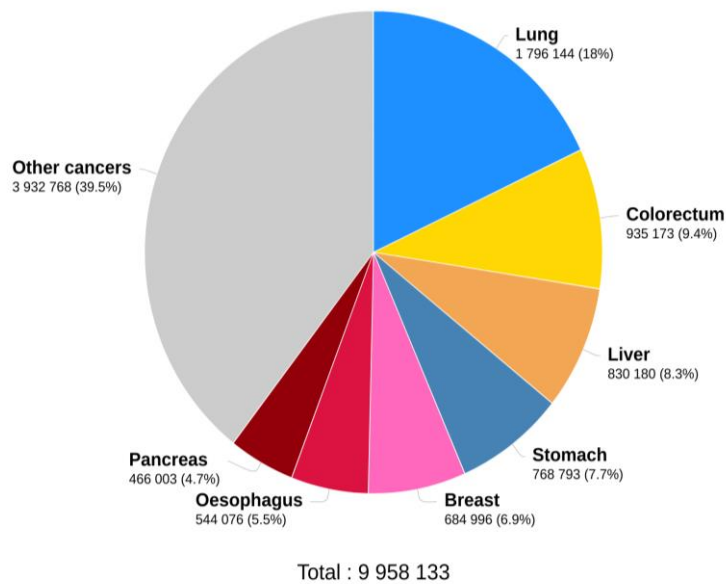


Data source: Globocan 2020  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)



Fuente: (WHO, 2020).

**Gráfico 3-** Muestra el número de muertes durante 2020, en todo el mundo de ambos sexos, se divide por colores de acuerdo al predominio del tipo de cáncer con mayores casos de mortalidad.



Data source: Globocan 2020  
Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr>)

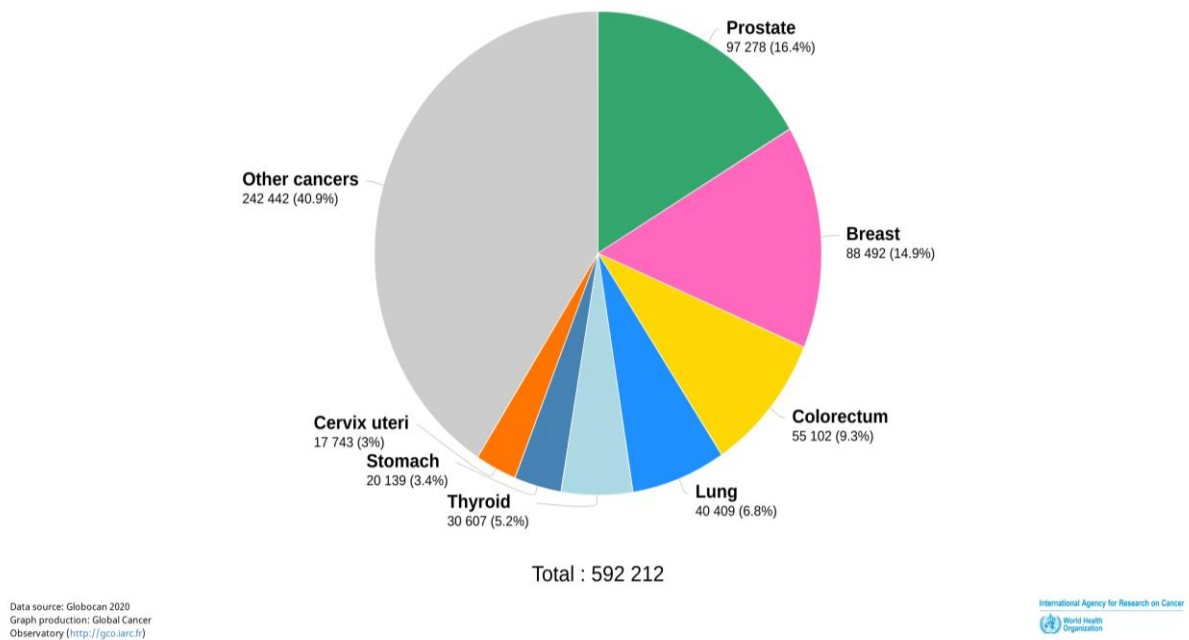


Fuente: (WHO, 2020).

La incidencia del cáncer estimada por el Instituto Nacional de Câncer (INCA) en Brasil durante el 2020 fue de 65.840 mil nuevos casos para el cáncer de próstata y 66.280 mil para el cáncer de mama, mientras que la mortalidad en hombres durante el 2019 fue de 16.733 mil para los canceres de tráquea, bronquios y pulmón, mientras que en la mujer hubo 18.068 mil casos causados por cáncer de mama. Proyectan que habrá 625 mil nuevos casos de cáncer entre 2020-2022 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019).

Según IARC en Brasil, se estima que el cáncer de piel no melanoma es el más incidente, seguido de los tumores de próstata, mama femenina, colon, recto o colorrectal, pulmón, tiroides, estómago y cuello uterino (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020).

**Gráfico 4-** Muestra el número de casos en Brasil durante el 2020, de ambos sexos y todas las edades, se divide por colores de acuerdo al predominio del tipo de cáncer con mayor incidencia durante el año.



Fuente: (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2020).

El cáncer puede ser definido como un conjunto de enfermedades similares, que se caracterizan por el desarrollo de células anormales, que se diseminan a cualquier parte del cuerpo. Normalmente las células se dividen y se diferencian en células específicas y en cierto momento mueren, ya las células tumorales se dividen sin control, a veces, perdiendo la capacidad de morir, y esta multiplicación celular puede llegar a generar masas, denominadas

“tumores” o “neoplasias”, que en su expansión pueden destruir y sustituir a los tejidos normales, sin embargo no todos los tipos de tumores originan cáncer, pudiendo encontrar tumores benignos y tumores malignos (que dan origen al cáncer) (CANCERQUEST, 2021).

El diagnóstico del cáncer es realizado por médico clínico especialista en oncología, el cual inicialmente realiza una serie de preguntas frecuentes, un examen físico y luego pasa a ordenar varios tipos de análisis de laboratorio, que son realizados para detectar anomalías en la salud de la persona que pueda determinar problemas específicos ya sea para confirmar o descartar el cáncer, pues estos análisis de laboratorios de por sí solas no pueden proveer un diagnóstico definitivo de cáncer o ya sea de otra enfermedad (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2013).

Por lo tanto es realizada otras pruebas con imágenes la cual existen varios tipos, cada una para determinar ciertos tipos de cáncer o tumores, algunas son tomografía computarizada (TC), resonancia magnética, gammagrafía ósea, mamografía entre otras. Por último es realizada una biopsia para confirmar el carácter tumoral del tejido. Una vez confirmado el diagnóstico de cáncer, el médico puede realizar otras pruebas para determinar el tipo de tratamiento a ser utilizado, para cada tipo de cáncer y paciente, se crea un determinado tipo de tratamiento (INSTITUTO NACIONAL DE CANCER, 2011).

Los antitumorales son compuestos que favorecen al sistema inmunológico ayudando a controlar la propagación del cáncer, inhibiendo el crecimiento de las células cancerosas, ya sea provocando la muerte o suicidio celular, deteniendo su ciclo celular al no permitir su replicación o realizando el aumento de unas proteínas especiales que indican estrés celular. La mayoría de los agentes anticancerígenos son de origen natural, gran cantidad de estos fármacos proviene de organismos terrestres o marinos, y poseen actividad antitumoral intrínseca, derivada de sus complejas estructuras que los convierten en moléculas muy tóxicas. Estas drogas no tienen especificidad por células tumorales, causando la muerte indiscriminada de las células que se encuentran en división celular e causando efectos secundarios muy nocivos en los pacientes. Debido a esta toxicidad las investigaciones por compuestos antitumorales han aumentado buscando encontrar agentes que causen menos efectos secundarios (FERRAZ *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2001; XUE *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2000).

El taxol es un potente medicamento utilizado en la quimioterapia para tratar varios tipos de cáncer como mama, ovario, pulmón, entre otros. En una investigación realizada en China con plantas medicinales *Taxus mairei*, una de las principales fuentes de taxol, *Cephalataxus fortunei* (de la *Cephalataxus* se conoce cuatro alcaloides desarrollados

como medicamentos para tratar la leucemia que son harringtonina, isoharringtonina, homoharringtonina y dexoharringtonina aislados de *Cephalataxus sinensis*, *Cephalataxus hainanensis* y *Cephalataxus oliveri*) y *Torreya grandis*. Lograron aislar de dichas plantas cepas con actividades anticancerígenas, las más activas pertenecen a seis géneros de hongos endófitos siendo *Paecilomyces* sp., *Cephalosporium* sp., *Cladosporium* sp., *Mortierella* sp., *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp. (HUANG *et al.*, 2001).

Otros investigadores realizaron análisis (HONGYAN *et al.*, 2016) sobre la estructura de un polisacárido encontrado en *Trichoderma* sp. KK19L1, el TP1A y su efecto antitumoral mediante la detención del ciclo celular y la apoptosis, utilizando células de carcinoma de cuello uterino humano (Hela) y las células de carcinoma de mama humano (MCF-7). El estudio demostró que las actividades antitumorales eran efectivas al inhibir la viabilidad celular e inducir la apoptosis celular pero dependían de la concentración de extracto utilizado. También se investigó las actividades anticancerígenas de la enzima L-metioninasa de *Trichoderma harzianum*, donde se constató que la L-metioninasa presenta alta eficacia contra líneas celulares cancerosas (línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y hepatocelular líneas celulares de carcinoma (Hep-G2) tanto *in vitro* como en condiciones *in vivo* (SALIM *et al.*, 2020).

La mayoría de los compuestos antitumorales actuales presentan inespecificidad porque actúan sobre células en división celular, y además de las células tumorales, células saludables se encuentran en este estado. Así, células epiteliales, células capilares, células sanguíneas, entre otras, se ven afectada por los compuestos antitumorales y su muerte causa efectos colaterales graves en los pacientes. Además, al utilizar constantemente un antitumoral, las células tumorales sobrevivientes son seleccionadas para aumentar sus mecanismos de resistencia. Después de cierto tiempo, concentraciones bajas del antitumoral no tiene efecto y es necesario cambiar el tipo o aumentar la dosis. De esta forma, resulta necesario encontrar nuevas moléculas capaces de matar células tumorales y presentar pocos efectos colaterales (FERRAZ *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2001; XUE *et al.*, 2015; ZHENG *et al.*, 2000). La biodiversidad del PNI puede permitir encontrar estas moléculas ya que contiene especies fúngicas desconocidas y/o poco estudiadas. Este trabajo objetiva estudiar hongos del PNI para determinar algún posible efecto antitumoral.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GENERAL:

Seleccionar hongos aislado del PNI capaz de producir compuestos con actividad antitumorales.

#### 3.2 ESPECIFICOS:

- Seleccionar hongos de la Colección de Cultura de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental (CCMIBA) para Bioprospección.
- Cultivar los hongos en medio líquido para obtención del extracto fúngico conteniendo los metabolitos secundarios.
- Evaluar el efecto de los extractos fúngicos en el cultivo de líneas tumorales derivadas de tumores sólidos de páncreas.

## 4 METODOLOGÍA

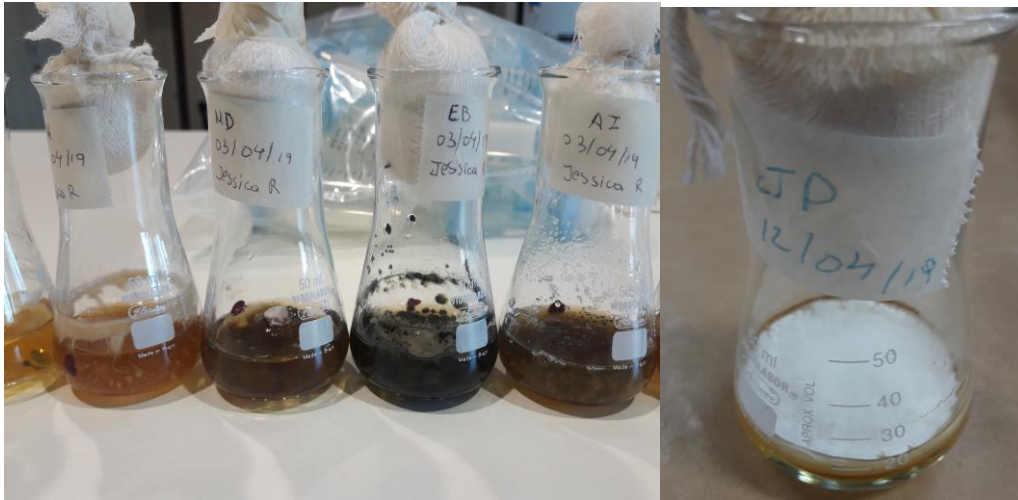
### 4.1 MICROORGANISMOS TESTADOS

Fueron estudiados 20 hongos aislados del Parque Nacional do Iguazu, conservados en el Laboratorio de Bioquímica y Microbiología de UNILA en la Colección de Cultura de Microorganismos de Importancia Biotecnológica y Ambiental (CCMIBA): *Fusarium* sp. MD, *Fusarium* sp. BF, *Fusarium* sp. IT, *Fusarium* sp. JL, *Fusarium* sp. DF, *Cladosporium* sp. EB, *Trichoderma* sp. KQ, *Trichoderma* sp. AI, y aislados no identificados taxonómicamente IF, AH, JM, IL, JI, CE, CX, BP, PK, CH, JP, HQ.

#### 4.1.2 Cultivo de hongos y preparo de los extractos

Los aislados fueron cultivados en Erlenmeyer con medio líquido de extracto de Malta al 2% (MA2) se pueden observar en las Figuras 3 y 4, e incubados a 130 rpm por siete días a 28 °C con constante agitación. Los ensayos fueron preparados inoculando fragmentos de medio sólido MA2 de 2 cm x 2 cm conteniendo micelio fúngico, realizando un control en el cual no se cultivó ningún hongo, solo se incubo el medio líquido con el fin de observar si existía alguna contaminación del propio medio. Luego del cultivo los extractos fueron obtenidos por medio de filtración primeramente colocando una gasa en el interior del embudo para la eliminación de residuos macrocelulares, y en seguida con una jeringa con filtro Millex 0,22µm (Millipore, MA) para la eliminación de residuos microcelulares. Los extractos de hongos fueron almacenados a -80 °C hasta su uso.

**Figura 3-** Fotografía de los hongos al ser cultivados en el Erlenmeyer.



Fuente: Propia del autor.

**Figura 4-** Fotografía de los hongos cultivados en el Erlenmeyer.



Fuente: Propia del autor.

#### 4.1.3 Cultivos de células tumorales

En los cultivos celulares se empleó una línea tumoral derivada de tumor sólido de páncreas, fueron usadas células MiaPaca-2 (ATCC® CRL-1420™). Las células se cultivaron en frasco para cultivo celular en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)) complementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Gibco, Brasil), penicilina 100U/mL, y estreptomicina 100g/mL (Sigma-

Aldrich®, EE.UU.). Las células fueron incubadas a 37 °C en incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad.

Las células fueron descongeladas de manera rápida. Para eso fue preparado en un tubo de falcón 9 mL del medio DMEM y luego se retiró el vial de criopreservación con las células del congelador utilizando el calor de la mano para favorecer el descongelamiento. Se le fue agregando 1 mL de medio con una micropipeta al vial realizando movimientos de succión para que se vaya descongelando y a la vez mezclando con el medio para ir transfiriendo al tubo todas las células. Luego fue centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm, pasado el tiempo se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* (células) en 5 mL de medio DMEM transfiriendo al frasco de cultivo.

El ensayo se mantuvo en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% (Thermo Forma, EE.UU.) por aproximadamente una semana, esperando el crecimiento celular, se observó cada día en un microscopio invertido para verificar si no existía alguna contaminación y cambiando el medio de cultivo cada dos o tres días según la confluencia celular. Una vez llegado a la confluencia máxima de 80% de células, que significa la mayor superficie de crecimiento de células dentro del frasco, se procedió a la tripsinización celular para evitar la aglomeración de las mismas.

Fue descartado el medio DMEM y las células fueron lavadas con 5 mL de Tampón fosfato salino (PBS) que luego fue descartado, posterior a eso se adicionaron 2 mL de tripsina, la cual se dejó actuar por 2 a 3 minutos para romper los enlaces de las proteínas por hidrólisis haciendo que las células se suelten del frasco. A los 2 o 3 minutos, el frasco de cultivo fue observado en un microscopio invertido, una vez que las células se soltaron, todas las células se transfirieron a un tubo de falcón con medio DMEM completo para inactivar a la tripsina.

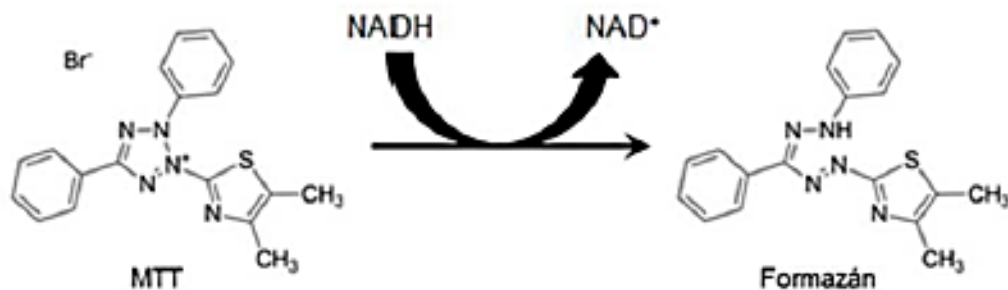
El ensayo fue centrifugado por 10 minutos a 1200 rpm, y el sobrenadante descartado. Después el *pellet* fue resuspendido en 1 mL de medio DMEM, 10 µL de células con 10 µL de azul de Tripán se colocaron en la cámara de Neubauer para determinar la cantidad y la viabilidad celular. En un frasco fue colocado aproximadamente 2 mL de medio completo y se transfirió del tubo las células resuspendidas completando el volumen hasta 5 mL con el medio DMEM completo. Las células fueron expandidas y mantenidas repitiendo el procedimiento anterior hasta que fueron realizados los experimentos.



#### 4.1.4 Viabilidad celular con extractos de hongos

Los métodos para determinar el crecimiento y la viabilidad celular de un cultivo son variados, aunque en su mayoría lenta y cara, el nuevo método colorimétrico basado en MTT permite obtener, con menor costo y en pocas horas resultados fiables. El MTT fue utilizado por Mosmann por primera vez en la evaluación de la quimiosensibilidad de los cultivos celulares neoplásicos, y posteriormente el método ha sido mejorado por otros autores. Se utiliza Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) el cual sufre una reducción metabólica realizada por la enzima deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul estirando a violeta (formazán) como se puede observar en la Figura 5 sus estructuras, permitiendo determinar la funcionalidad de las células tratadas (RIVAS *et al.*, 2016).

**Figura 5-** Estructura del MTT y su producto el formazán.



Fuente: (RIVAS *et al.*, 2016).

Para las pruebas de proliferación celular con el fin de determinar la disminución de la viabilidad celular, se realizó un cribado inicial utilizando el ensayo de proliferación de células MTT donde las células tumorales MiaPaca-2, se sembraron  $1 \times 10^4$  células tomando 50  $\mu\text{L}$  de estas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, iniciando en la segunda fila y segunda columna, en las primeras fueron agregados 200  $\mu\text{L}$  de PBS como control cero (Corning, EE.UU) y fueron incubadas 24 h.

Por consiguiente, las células se incubaron por otras 24 h con 50  $\mu$ L de las concentraciones de los extractos de hongos, preparados por diluciones 2x (veces) la concentración de los extractos a analizar, realizando diluciones seriadas, como demostrado en la Tabla 1.

**Tabla 1-** Preparación de las diluciones de los extractos fúngicos.

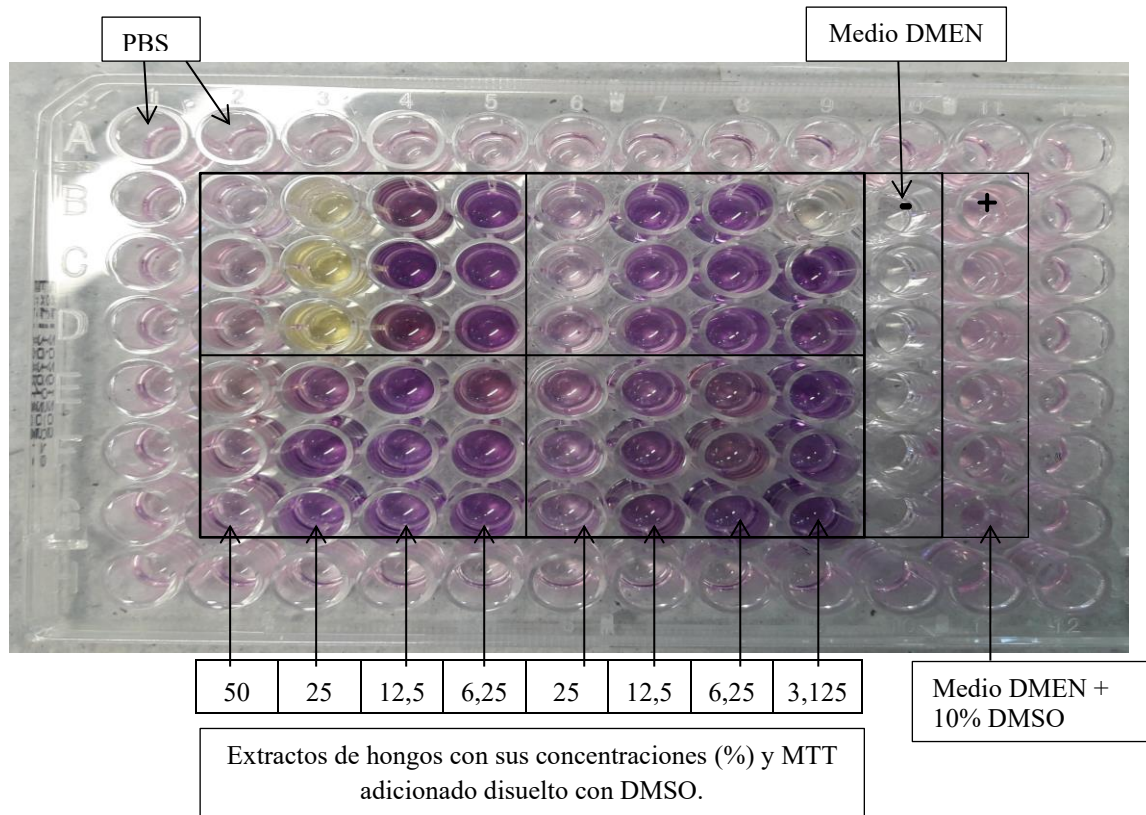
	Tubo 2x %	Final %	Medio $\mu$ L	Tubo partida	Total $\mu$ L	Volumen final $\mu$ L
1	100	50	0	400	400	200
2	50	25	200	200	400	200
3	25	12,5	200	200	400	200
4	12,5	6,25	200	200	400	200
5	6,25	3,125	200	200	400	200

Fuente: Propia del autor.

Cada placa fue utilizada para evaluar tres extractos de hongos, además se realizó un control negativo sin ningún tipo de extracto agregado a las células, a la cual solo se le agrego 50  $\mu$ L medio DMEN completo, y un control positivo conteniendo 50  $\mu$ L del medio DMEN con 10% de Dimetil sulfóxido (DMSO).

Después de 24 h de incubación, se agregó 10  $\mu$ L MTT (5mg/L) a toda la placa incluyendo los controles, después de 4 h, los cristales fueron disueltos con 100  $\mu$ L de DMSO y la viabilidad celular se determinó cuantificando la absorbancia a 492 nm y 630 nm en espectrofotómetro (Lectora de Microplacas (y Placas de Elisa) – LMR-96 FLEX). Los datos de Abs se transformaron en porcentaje de viabilidad celular, y una curva de viabilidad celular se realizó en función de la concentración. Normalizando los datos y aplicando la regresión no lineal, se determinó la concentración inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>), se puede observar en la Figura 6 el ensayo MTT ejemplificado.

**Figura 6-** Ensayo de MTT. Placa de 96 pozos, con y sin extracto de hongos, línea celular de cáncer de páncreas (Miapaca-2).



Fuente: Propia del autor.

#### 4.1.5 Análisis estadístico

Para la verificación de las diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros de las células cancerosas y los extractos, se realizó un análisis estadístico descriptivo y una regresión no lineal para determinar el  $IC_{50}$  utilizando el software *Graphpad Prism 5®* paquete estadístico. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  SD de tres experimentos diferentes realizados teniendo en cuenta un valor de  $P < 0.05$  estadísticamente significativo.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIONES

Llevando en consideración la concentración inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>) los resultados mostraron extractos fúngicos capaces de inhibir el crecimiento celular, sin embargo, también extractos fúngicos que aumentaron la proliferación celular. Fue posible calcular el valor de IC<sub>50</sub> para los hongos: IL, MD, BF, EB, BP, CH, PK, IT, CX, KQ, CE, presentados en la Tabla 2, ordenados de mayor a menor valor de IC<sub>50</sub>. Estos hongos fueron seleccionados para su evaluación completa en todas las concentraciones testadas.

**Tabla 2-** Valores obtenidos de IC<sub>50</sub> para los extractos de hongos que inhibieron el crecimiento celular de Miapaca-2.

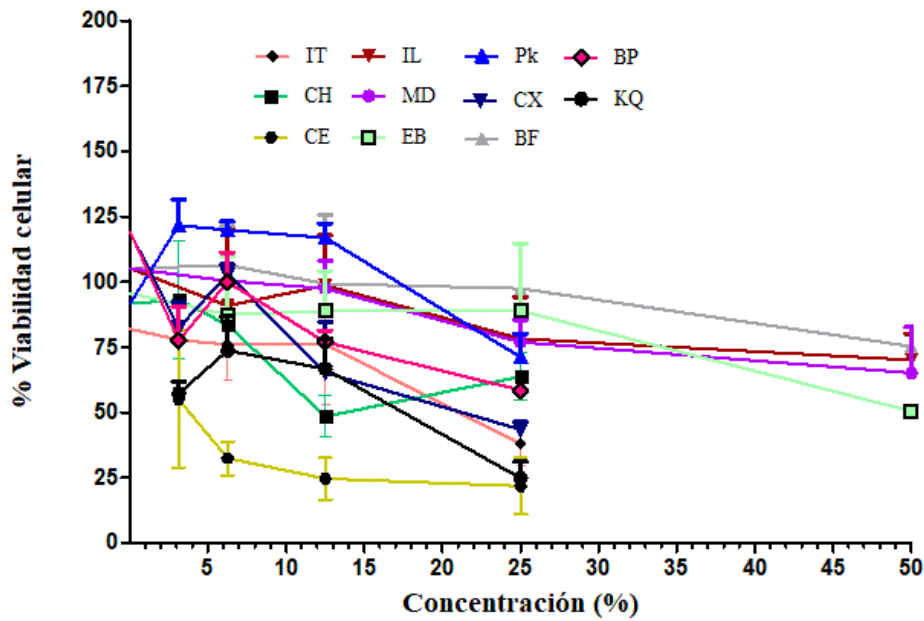
Hongos	IC <sub>50</sub> (%)
IL	104,3
<i>Fusarium</i> sp. MD	69,91
<i>Fusarium</i> sp. BF	67,72
<i>Cladosporium</i> sp. EB	67,60
BP	40,10
CH	30,27
PK	~25,85
<i>Fusarium</i> sp. IT	24,25
CX	20,81
<i>Trichoderma</i> sp. KQ	13,29
CE	3,312

Fuente: Propia del autor

El IC<sub>50</sub> no se pudo obtener de los demás hongos (IF, AH, JM, JL, DF, JI, AI, JP, HQ) debido a que las concentraciones testadas de los mismos no crearon una queda en la curva de proliferación celular. Esta se obtiene cuando la curva de proliferación cae por debajo de 50% de viabilidad celular en sus últimas concentraciones, creando valores que al realizar una regresión no lineal con un programa calcula automáticamente los valores de IC<sub>50</sub>, en nuestro caso utilizamos el software *Graphpad Prism 5*®, lo que indica que estos hongos no son tóxicos para las células Miapaca-2.

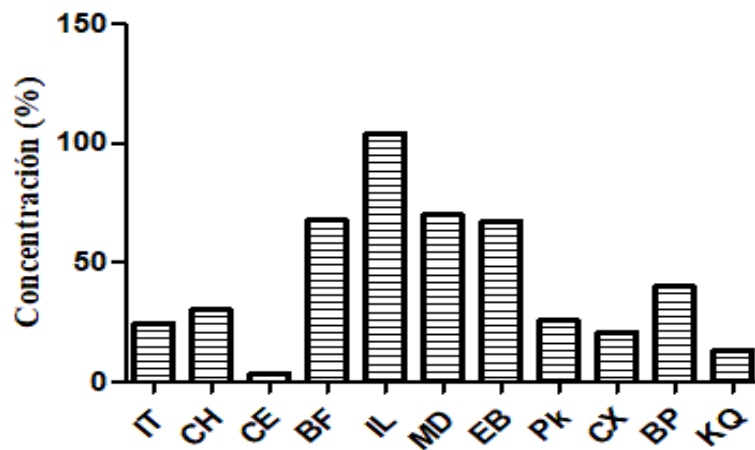
En base a la concentración de IC<sub>50</sub>, se puede observar en el Gráfico 5 la curva obtenida de los extractos fúngicos que fueron capaces de inhibir el crecimiento celular en sus distintas concentraciones y en el Gráfico 6 los valores de IC<sub>50</sub> de los mismos.

**Gráfico 5-** Viabilidad celular vs Concentración del extracto fúngico teniendo en cuenta la concentración inhibitoria del 50% (IC<sub>50</sub>).



Fuente: Propia del autor.

**Gráfico 6-** Valores del IC<sub>50</sub> de los extractos fúngicos.



Fuente: Propia del autor.

Observando el Gráfico 5, el hongo CE (no identificado) mantiene una inhibición del crecimiento celular similar en casi todas las concentraciones testadas con ella (25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%), demostrando ser un buen inhibidor del crecimiento celular Miapaca-2 en poca concentración. Notamos que el hongo *Trichoderma* sp. KQ en concentraciones de 12.5% y 6.25% presenta crecimiento similar de las células, ya en las

concentraciones 3.125% y 25% inhiben el crecimiento celular, siendo el 25% la mejor concentración testada que demostró mayor inhibición del crecimiento celular Miapaca-2. Ya el hongo CX presenta un crecimiento de células similar en las menores concentraciones (6.25%, 3.125%), mostrando un descenso en el crecimiento celular Miapaca-2 en las concentraciones de 25% y 12.5%, siendo la concentración más alta (25%) con mejor eficiencia en inhibir el crecimiento celular. El hongo *Fusarium* sp. IT, demuestra un crecimiento similar en las concentraciones bajas, ya en la concentración del 25% muestra inhibición del crecimiento celular Miapaca-2, por otra parte, el hongo PK mantiene un crecimiento celular en casi todas las concentraciones, siendo el 25% la concentración en la cual presenta un descenso del crecimiento celular Miapaca-2.

Siguiendo con el Gráficos 5, el hongo CH muestra inhibición del crecimiento celular en la concentración de 12.5%, ya en las demás concentraciones testadas con ella (25%, 6.25%, 3.125%) mantiene cierta similitud en el crecimiento de las células. Para *Fusarium* sp. BP, en concentración del 25% presenta inhibición celular Miapaca-2, con las otras concentraciones presenta una pequeña variación con el crecimiento de las células. Los hongos *Cladosporium* sp. EB, *Fusarium* sp. BF, *Fusarium* sp. MD e IL se observa que todas las concentraciones testadas (50%, 25%, 12.5%, 6.25%) mantienen similitud en el crecimiento celular con las concentraciones bajas, así como se asemejan en la inhibición celular Miapaca-2 con la concentración del 50%. Por fin, pudiendo notarse una pequeña variación con el hongo *Cladosporium* sp. EB que demuestra mejor inhibición celular en la concentración del 50% que las demás.

Cuanto menor es el valor de  $IC_{50}$  nos indica que los extractos de hongos fueron eficaces a menor concentración a la hora de inhibir el crecimiento celular Miapaca-2, lo que pensando en un potencial biotecnológico significaría que se necesitara menos concentración de un fármaco para inhibir el crecimiento de la célula cancerosa. Sin embargo, podemos observar que el valor del hongo IL es muy alto lo que podría indicar que el programa calculo un valor estimativo de  $IC_{50}$  en vista a que el extracto inhibió el crecimiento celular hasta cierto punto como sucede con los hongos BF, MD, IL, que mantuvieron el crecimiento celular en casi todas las concentraciones, lo que se puede observar en el Gráfico 6.

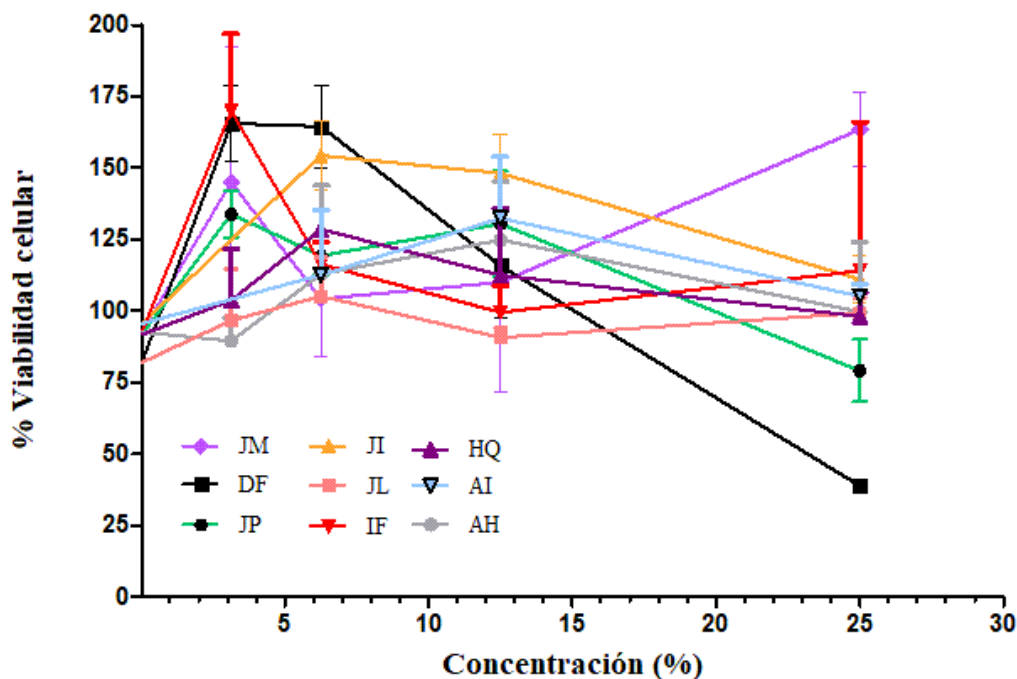
El  $IC_{50}$  del hongo PK fue calculado como un aproximado (~) por el programa, se puede observar en el Gráfico 5, como el hongo mantenía un crecimiento celular similar, hasta que en la concentración del 25% tiene cierta inhibición en el crecimiento celular Miapaca-2, podría indicarnos que hubo algún error en el experimento o el programa realizo un

cálculo de tendencia, utilizando los valores que no se utilizó para testar, pero que por la inclinación de la curva permitió el cálculo del valor  $IC_{50}$ .

Los hongos CE, CX y el *Trichoderma* sp. KQ, fueron los que presentaron menor valor de  $IC_{50}$ , puede verse Gráfico 6, demostrando que son los que poseen mayor potencial antitumoral, siendo así importantes para invertirse en sus estudio, ya que si aislados su compuesto toxico y concentrado pueden llegar a tener mayor efecto.

Por otro lado, tenemos a los extractos que aumentaron el crecimiento celular Miapaca-2, visto en el Gráfico 7, la curva obtenida de los mismos con las concentraciones testadas.

**Gráfico 7-** Viabilidad celular vs Concentración del extracto fúngico teniendo en cuenta la concentración inhibitoria del 50% ( $IC_{50}$ ).



Fuente: Propia del autor.

El hongo IF presenta mayor proliferación celular en la menor concentración testada (3.125%), teniendo un crecimiento similar en las demás concentraciones (25%, 12.5%, 6.25%), seguida del hongo *Fusarium* sp. DF que mantiene un crecimiento celular Miapaca-2 en las concentraciones bajas testadas con ella (3.125% y 6.25%), se puede notar que en la concentración más alta (25%) tiene cierta inhibición del crecimiento celular, sin embargo, no

genero ningún valor de  $IC_{50}$  ya que en las demás concentraciones mantiene un crecimiento celular.

Ya el hongo JM presenta mayor proliferación celular Miapaca-2 en las concentraciones 3.125% y 25%, siendo 25% la que presenta mayor proliferación, en las concentraciones 12.5% y 6.25% presenta similitud en el crecimiento celular Miapaca-2. Por otro lado el hongo JP muestra mayor proliferación celular con la concentración más baja testada (3.125%) y similitud en el crecimiento con la concentración 12.5%, demostrando menor proliferación celular Miapaca-2 en la concentración más alta 25%.

El hongo JI mantiene el crecimiento celular Miapaca-2 en las concentraciones 6.25% y 12.5%, pero demuestra menor proliferación en la concentración del 25%. Los hongos *Fusarium* sp. JL y HQ presentan similitud en el crecimiento celular en las concentraciones (25%, 3.125%), siendo 6.25% la concentración con mayor proliferación celular Miapaca-2 que presentaron ambos. El hongo AH presenta mayor proliferación celular en la concentración 12.5%, ya las demás concentraciones testadas con ella son similares en la proliferación. Por último se puede notar que el hongo *Trichoderma* sp. AI presenta una proliferación celular Miapaca-2 constante en las concentraciones testadas con ella, siendo 12.5% la que presenta mayor proliferación de las células Miapaca-2.

Esta proliferación celular en las células tumorales MiaPaca-2 pudo ser causada porque los extractos actuaron como factores de crecimiento o actuaron sobre las mitocondrias generando falsos positivos. En este caso, se debería observar si estos extractos presentan el mismo efecto sobre células normales, porque si fuera así, podrían ser utilizados para la regeneración celular, esto generalmente se traduce en aumento de sobrevida y proliferación.

Estos resultados comprueban que existen hongos dentro de los aislados del PNI con potencial biotecnológico alcanzando el objetivo del presente estudio, aunque no sabemos con exactitud qué compuestos poseen estos hongos los cuales permitieron el crecimiento o disminución de las células tumorales MiaPaca-2.

Por otro lado el ensayo MTT también nos generó resultados con disminución de la proliferación celular en las células tumorales MiaPaca-2, esto puede estar ligada a dos efectos, citotóxico o citostático, el primero causa daños o muertes a las células cancerosas pero generalmente no es muy específica, ya la segunda inhiben o demoran el crecimiento de las células cancerosas siendo más específica.

La mayoría de los hongos estudiados forman parte del género *Fusarium* sp., la misma forma parte del filo Ascomycota, clase Sordariomycetes, orden Hypocreales y



familia Nectriaceae. Es un género de hongos filamentosos cosmopolitas distribuidos en el suelo y en asociaciones con plantas, las especies de *Fusarium* sp. son saprofitas y causantes de muchas enfermedades en plantas, algunas son patógenas para humanos (SANIDAD *et al.*, 2015).

Estas especies se identifican generalmente por sus características observadas micro y macroscópicas, para el diagnóstico de enfermedades se utilizaba preferiblemente el método del examen microscópico de tejidos enfermos y por caracterización morfológica del patógeno, sin embargo, tardaba mucho tiempo y actualmente, los eucariotas se identifican en función a la secuencia de nucleótidos preservados mediante amplificación por PCR. Las técnicas basadas en PCR se utilizan regularmente para la identificación, caracterización y diagnóstico temprano de microbios y patógenos (SINGHA *et al.*, 2016). Algunos de los hongos estudiados aún no han sido identificados, sin embargo nuevos estudios están siendo realizados por el grupo para la caracterización taxonómica de los mismos, siendo esto necesario para luego poder seguir con los análisis.

En una investigación realizada por (HUANG *et al.*, 2001) aislaron hongos endófitos de plantas medicinales con actividades antitumorales y antifúngicas de varios géneros realizando pruebas de citotoxicidad con células cancerosas humanas (Células HL-60, células KB, células Hela, células SPC-A-1 y Células MCF-7). Algunos de los hongos coinciden con los géneros estudiados en el presente estudio *Cladosporium*, *Trichoderma* y *Fusarium*.

En otro estudio (HUANG *et al.*, 2007) también realizado con plantas medicinales aislaron hongos endófitos con actividades antioxidantes. Los antioxidantes pueden prevenir o retrasar daños a las células lo que podría explicar el aumento de la proliferación observado en los resultados presentados en este trabajo.

Xue y colaboradores en 2015 investigaron las actividades antitumorales e inmunomoduladoras de extractos de *Pleurotus Eryngii* conocido como hongos ostra rey, que posee varias sustancias bioactivas, realizando pruebas con células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y MCF-7 *in vitro* y con células CD-1 de sarcoma de ratón *in vivo*, con la investigación demostraron que el extracto contiene efectos antitumorales tanto *in vivo* e *in vitro* además de aumentar las actividades inmunes (XUE *et al.*, 2015).

Investigaciones previas utilizando varias especies del género *Fusarium* sp. demuestran que tienen gran potencial para la producción de bioactivos con capacidad para aplicaciones biotecnológicas.

El trabajo de Clarence y colaboradores de nanopartículas de oro (NP) producidas a partir del hongo endófito *Fusarium solani*, que poseían actividades anticancerígenas *in vitro* en células de cuello uterino (Hela) y contra células de cáncer de mama (MCF-7), encontrando que las NP sintetizadas inducen la apoptosis de las células cancerígenas (CLARANCE *et al.*, 2020).

El trabajo de Liu y colaboradores es la investigación más reciente, en la cual aislaron dos compuestos nuevos, denominados fusariumtrin A y climacomontaninato D, del cultivo de arroz de *Fusarium* sp. LGWB-7, junto con otras ocho ya conocidas (dihidropiridin-2 (1 H) -ona, lumichrome, flazina, ácido fusárico, 4b-acetoxiprobotryane-9b, 15a-diol, trichoderiol B, trichoderiol A y beauvericin), este es un hongo entomógeno aislado de *Harmonia axyridis*. Empleando ensayos de citotoxicidad con cuatro líneas celulares de cáncer humano (células de cáncer gástrico SGC-7901, células de leucemia mieloide crónica K562, células de cáncer de pulmón A549 y células de cáncer de cuello uterino Hela), hallaron que la beauvericin demostró mayor citotoxicidad contra las líneas celulares y aseguran que es un valor comparable con la del fármaco cisplatino utilizado contra células de leucemia mieloide crónica K562 (LIU *et al.*, 2021).

Visando el perfeccionamiento del potencial detectado en los hongos del presente estudio y para la obtención de respuestas más claras, nuevas pruebas deben ser realizadas, algunas técnicas que pueden ser realizadas primeramente para la detección de células apoptóticas el ensayo más importante es la Anexina V es una proteína recombinante y al unirse con fosfatidilserina que se encuentra en la membrana plasmática de la célula se convierte en un biomarcador de células apoptóticas, que combinada con el marcador Yoduro de Propidio (PI) garantiza la diferenciación de células apoptóticas, células en apoptosis temprana y células necróticas (MARTÍNEZ SALAZAR, 2009), con esta técnica determinaríamos como los extractos de los hongos del presente estudio disminuyen el crecimiento celular o si hubo muerte celular por apoptosis o necrosis. Varios estudios demuestran la efectividad de esta técnica para determinación de células apoptóticas, las muestras son analizadas en citometría de flujo que proporciona una cuantificación rápida (ELAMIN *et al.*, 2021; LIMA *et al.*, 2020; SHANG *et al.*, 2019).

El segundo estudio que se puede realizar es la determinación de la proteína Ki67 por ser un marcador asociado a la proliferación celular y es una forma de medir la proliferación celular de un tumor empleando técnicas inmunohistoquímicas, pues esta se halla expresado en todo el ciclo celular (G1, M, G2, S) excepto el G0, siendo que la propia célula lo sintetiza para su proliferación se le correlaciona con un elevado nivel mitótico, por lo que se

utiliza para cuantificar la proliferación celular en una determinada área de tejido, así un elevado resultado del mismo estaría directamente relacionado al tamaño o capacidad de invasión del tumor (BRITO *et al.*, 2008; ESCOBAR, 2011; PANAL *et al.*, 2017). En base a estudios realizados con esta técnica, se demuestra que esto podría indicarnos si los extractos de hongos indujeron la proliferación celular o si resulta ser un falso positivo. Por último, luego de desempeñar esas técnicas, efectuar un análisis para separar a los compuestos mayoritarios con mejor efectos que son viables para su utilización biotecnológica.

En vista a las varias investigaciones llevadas a cabo con hongos tanto de los mismos géneros utilizados aquí en el estudio, como con varios otros géneros podemos inferir que los resultados presentados en este trabajo son prometedores para su aplicación biotecnológica llevando en consideración las nuevas pruebas propuestas.

## 6 CONCLUSIONES

Existen varias investigaciones que demuestran que los microorganismos incluyendo los hongos, tienen gran potencial para aplicación biotecnológica, y son fuentes potenciales para la creación de bioactivos, fármacos, para encontrar biomarcadores, blancos terapéuticos en protocolos de laboratorios y tratamientos para menguar el cáncer, así como métodos de detección precoz mediante la actividad de aumento de la proliferación celular.

Pudimos observar en los resultados que los aislados del PNI pueden ser cultivados en el laboratorio y a partir de estos generar extractos que presentan actividad biológica sobre células humanas.

Algunos hongos del PNI poseen actividades antitumorales contra las líneas celulares Miapaca-2, lo que demuestra que el PNI es una reserva con potencial para la realización de más estudios con la finalidad de encontrar nuevos microorganismos que se puedan emplear tanto en biotecnología como en otras áreas, además de obtener resultados favorables sobre los hongos estudiados con potencial antitumoral, lo que conlleva a posibles aplicaciones biotecnológicas.

## REFERENCIAS

- BENGTSSON-PALME, J. Microbial model communities: To understand complexity, harness the power of simplicity. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 18, p. 3987–4001, 2020.
- BRITO, J. et al. Causantes De Acromegalia. p. 831–836, 2008.
- CANCERQUEST. Propiedades del cáncer : crecimiento sin señales estimulantes Propiedades del cáncer : Fallas al responder a las señales de detención Propiedades del cáncer : Número ilimitado de divisiones celulares. 2021.
- CLARANCE, P. et al. Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using endophytic fungi *Fusarium solani* and its in-vitro anticancer and biomedical applications. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 27, n. 2, p. 706–712, 2020.
- DUQUE CASTAÑO, D. CAROLINA. Efecto De Borde En Hongos De Un Bosque Atlántico Semideciduo. p. 52, 2016.
- ELAMIN, M. et al. Anti-proliferative and apoptosis induction activities of curcumin on *Leishmania major*. **Revista Argentina de Microbiología**, n. xxxx, 2021.
- ESCOBAR, I. Valor pronóstico de la determinación del antígeno Ki-67 en estadios quirúrgicos del cáncer de pulmón no célula pequeña. 2011.
- FERRAZ, R. et al. Antitumor Activity of Ionic Liquids Based on Ampicillin. **ChemMedChem**, v. 10, n. 9, p. 1480–1483, 2015.
- FIERER, N. et al. Cross-biome metagenomic analyses of soil microbial communities and their functional attributes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 52, p. 21390–21395, 2012.
- GENTRY, T. J. et al. **Microbial Diversity and Interactions in Natural Ecosystems**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015.
- GIBBONS, S. M. et al. Microbial diversity-exploration of natural ecosystems and microbiomes. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 35, p. 66–72, 2015.
- HONGYAN, L. et al. Structure Studies of the Extracellular Polysaccharide from *Trichoderma* sp . KK19L1 and Its Antitumor Effect via Cell Cycle Arrest and Apoptosis. 2016.
- HUANG, W. Y. et al. A potential antioxidant resource: Endophytic fungi from medicinal plants. **Economic Botany**, v. 61, n. 1, p. 14–30, 2007.
- HUANG, Y. et al. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 163–167, 2001.
- IARC, G. **Brazil, Globocan 2018**, 2019. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>

- IARC, G. Cancer Today. Estimated number of new cases in 2020, both sexes, all ages. n. 79, p. 2021, 2020.
- INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. ¿Cómo se diagnostica el Cancer? p. 1, 2011.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa | 2020 Incidência de Câncer no Brasil/ Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** [s.l: s.n.].
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Brazil, Globocan 2020. v. 278, p. 1–2, 2020.
- LANG, G. et al. Paecilosetin, a new bioactive fungal metabolite from a New Zealand isolate of Paecilomyces farinosus. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 5, p. 810–811, 2005.
- LIMA, K. et al. Dpi, Um Inibidor De Nox/Duox, Induz Apoptose E Amplifica Os Efeitos Antineoplásicos De Ruxolitinibe Em Modelos Celulares De Neoplasia Mieloproliferativa. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**, v. 42, n. S 2, p. 121–122, 2020.
- LIU, S. S. et al. Two new compounds isolated from the entomogenous fungus Fusarium sp. LGWB-7. **Phytochemistry Letters**, v. 41, n. October 2020, p. 74–77, 2021.
- MARTÍNEZ SALAZAR, M. Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. XI, n. 2, p. 152–166, 2009.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Resultados de pruebas de laboratorio. **National Cancer Institute**, p. 1, 2013.
- PANAL, M. et al. Correlación entre la expresión de Ki67 con factores de mama precoz. v. 27, n. 4, 2017.
- PINHEIRO, E. A. A. et al. Bioprospecting of antimicrobial activity of extracts of endophytic fungi from Bauhinia guianensis. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 1, p. 3–6, 2017.
- PRIETO, C. M. et al. Microbial mat ecosystems: Structure types, functional diversity, and biotechnological application. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 31, p. 48–56, 2018.
- PUTRI, S. P. et al. Ophiosetin, a new tetramic acid derivative from the mycopathogenic fungus Elaphocordyceps ophioglossoides. **Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 4, p. 195–198, 2010.
- RIVAS, C. et al. Actividad citotóxica in vitro frente a células tumorales. **Investigación en plantas de importancia médica**, n. November, p. 269–312, 2016.
- SALAMUNI, R. et al. Parque Nacional do Iguaçu, PR - Cataratas de fama mundial. **Sítios geológicos e paleontológicos do Brasil**, p. 313–321, 2002.
- SALIM, N. et al. Purification, characterization and anticancer evaluation of l-methioninase

from *Trichoderma harzianum*. **3 Biotech**, v. 10, n. 11, 2020.

SANIDAD, G. D. E. et al. FICHA TÉCNICA *Fusarium* spp . ( Hypocreales : Nectriaceae ) Podredumbre de raíces. 2015.

SANTOS, H. G. DOS et al. O Novo Mapa de Solos do Brasil Legenda Atualizada. 2011.

SHANG, F. MIN et al. A small-molecule antagonist of CXCR1 and CXCR2 inhibits cell proliferation, migration and invasion in melanoma via PI3K/AKT pathway. **Medicina Clinica**, v. 152, n. 11, p. 425–430, 2019.

SINGHA, I. M. et al. Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 99–105, 2016.

SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TORRES, O. D. et al. La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. **Ciencia da Informacao**, v. 38, n. 3, p. 96–110, 2009.

UNESCO, W. H. C. **CC-86/Conf.003/10.Pdf**. 1986a

UNESCO, W. H. C. **Cc-86-Conf003-3E.Pdf**. 1986b

WHO. World fact sheets cancers. **Globocan 2020**, v. 419, p. 1–2, 2020.

WORLD HERITAGE COMMITTEE. Report of the rapporteur. Ninth Ordinary Session. n. December, p. 1–33, 1985a.

WORLD HERITAGE COMMITTEE. Item 9 of the Provisional Agenda: Nominations to the World Heritage List. n. October, p. 1–12, 1985b.

WRIGHT, J. et al. Checklist of the Mycobiota of Iguazú National Park (Misiones, Argentina). **Sociedad Argentina de Botánica**, v. 40, p. 1–22, 2005.

WU, B. et al. Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. **Mycology**, v. 10, n. 3, p. 127–140, 2019.

XUE, Z. et al. Antitumor and Immunomodulatory Activity of *Pleurotus eryngii* Extract. **Journal of Food Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 19–27, 2015.

ZHENG, Z. et al. Detection of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan Strait, China. **FEMS Microbiology Letters**, v. 188, n. 1, p. 87–91, 2000.