



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA
La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACEÚTICO

**“Evaluación de la actividad Citotóxica de Extractos Fúngicos de
Zamora Chinchipe y Saraguro en diferentes líneas celulares de
Cáncer”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Armijos Abad, Edwin Patricio.

DIRECTOR: Bailón Moscoso, Natalia Catalina, PhD.

LOJA – ECUADOR

2016



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

2016

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Doctora.

Natalia Catalina Bailón Moscoso.

DIRECTORA DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

CERTIFICA:

Que el presente trabajo, denominado: **“Evaluación de la actividad Citotóxica de extractos fúngicos de Zamora Chinchipe y Saraguro en diferentes líneas celulares de Cáncer.”** realizado por el profesional en formación: Edwin Patricio Armijos Abad; cumple con los requisitos establecidos en las normas generales para la Graduación en la Universidad Técnica Particular de Loja, tanto en el aspecto de forma como de contenido, por lo cual me permito autorizar su presentación para los fines pertinentes.

Loja, julio del 2016

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo **Armijos Abad Edwin Patricio** declaro ser autor a del presente trabajo de titulación: “Evaluación de la actividad Citotóxica de extractos fúngicos de Zamora Chinchipe y Saraguro en diferentes líneas celulares de Cáncer.” de la Titulación de Bioquímica y Farmacia siendo Natalia Catalina Bailón Moscoso directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f.....

Autora: Armijos Abad Edwin Patricio

Cédula: 1104598915

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mi familia quienes por ellos soy lo que soy a mis padres Patricio y Francisca, quienes han sabido guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis queridos abuelos Marco y Mercedes por estar siempre a mi lado por guiarme a lo largo de todo este proceso de formación, por no dejarme desmayar y darme todo su amor y apoyo incondicional en la culminación de mi proyecto.

A mis hermanos por estar siempre presentes en estos momentos, acompañándome en la culminación de mi carrera universitaria.

A mis amigos Adrián y Wilson que han estado brindándome sus conocimientos en la culminación de mi proyecto final siempre pendientes de mis errores.

A mi suegra Gladys que se ha compartido en una muestra de perseverancia y trabajo que ha estado motivando en la culminación de mi trabajo.

Y por último a mi esposa Dayanna y mi hija Danna Sofia que son las razones de mi vida, son los motores que me motivan a crecer cada día y que se han convertido en mis guías a lo largo de mi desarrollo profesional.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Técnica Particular de Loja, y a la Titulación de Bioquímica y Farmacia por formarme de forma profesional.

A la primera persona que se lo quiero agradecer es a mi directora de tesis la Dra. Natalia Bailón, sus conocimientos, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como profesional. Ella ha inculcado en mí un sentido de seriedad, responsabilidad y rigor académico sin los cuales no podría tener una formación completa.

A mi profesora María Isabel Ramírez que sin su apoyo y confianza no lo hubiera logrado, quien sea convertido en la persona de gran sabiduría y guía en el transcurso de mi formación.

A todas las personas que confiaron y depositaron su confianza, siempre estaré agradecido por el momento que me brindaron y su amor incondicional. Sencillo no ha sido el proceso, pero gracias a todos por transmitirme sus conocimientos, he logrado importantes objetivos como culminar el desarrollo de mi tesis con éxito y obtener una afable titulación profesional.

CONTENIDO

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Cáncer.....	6
1.1.1 Antecedentes Históricos.	7
1.1.2. Causas del Cáncer.....	7
1.1.3. Incidencia.	9
1.1.4. Cáncer de Mama.	10
1.1.5. Cáncer de Colorectal.	11
1.1.6. Astrocitoma Cerebral.	12
1.2. Tratamiento.....	12
1.2.1. Quimioterapia.	14
1.2.2. Antineoplásicos de origen fúngico.	14
1.2.2.1 Hongos Basidomicetos.	15
1.2.2.2 Importancia.	16
1.2.2.3 <i>Pycnoporus sanguineus</i>	17
1.2.2.4 <i>Trametes</i> sp.	17
1.2.2.4 <i>Collybia</i> sp.	18
1.2.3. Extractos de material fúngico.	19
1.2.3.1 Obtención de Extractos con Solvente.	19
1.3 Viabilidad y toxicidad celular.....	20
1.3.1 Determinación de Viabilidad mediante ensayo MTS.	21
CAPÍTULO II.	23

FIN DEL PROYECTO	23
2.1. Objetivo General:	24
2.2. Objetivos Específicos:.....	24
CAPÍTULO III.	25
METODOLOGÍA.....	25
3.1 Material Fúngico.	26
3.2 Obtención de Extractos.	26
3.3 Modelos Biológicos.	29
3.4 Cultivos Celulares.	30
3.5 Ensayo MTS.	30
3.6 Análisis Estadístico.	32
CAPÍTULO IV.	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. Evaluación del porcentaje de viabilidad de los extractos fúngicos.....	34
4.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos fúngicos a distintas concentraciones.	36
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA.....	44
ANEXOS	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista y nombres de especies fúngicas recolectadas de las zonas correspondientes a: Ingapirca (Saraguro), Picuta y Campana (Zamora Chinchipe).....27

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad de extractos fúngicos a una concentración de (100 $\mu\text{g/mL}$), \pm E.E sobre líneas celulares MCF-7, RKO, D-384 Y ZR.....33

Tabla 3. Valores correspondientes del IC_{50} a concentración de: 1 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 45 $\mu\text{g/ml}$, 60 $\mu\text{g/ml}$, 75 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, en líneas celulares (MCF-7, RKO, D-384, ZR).....35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características de las células cancerígenas.....	9
Figura 2. Índice de incidencia de cáncer en el mundo en ambos sexos.....	10
Figura 3. Taxonomía de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	17
Figura 4. Taxonomía de <i>Trametes</i> sp.....	18
Figura 5. Taxonomía de <i>Collybia</i> sp.....	19
Figura 6. Transformación del compuesto MTS a formazan.....	22
Figura 7. Mapa de ubicación zonas de muestreo Ingapirca sector Saraguro, Picuta y Campana provincia de Zamora Chinchipe.....	26
Figura 8. Líneas celulares tumorales.....	28

ABREVIATURAS

ATCC: The Global Bioresource Center.

DMSO: Dimetil sulfoxido.

DOXO: Doxorrubicina.

D-384: Línea celular tumoral de astrocitoma cerebral.

FIPS: Sustancias funcionales de proteínas fúngicas Inmunomodiladoras.

FIP-FVE: Papiloma humano virus-16 E7.

IFN-C: Interferón.

IC50: Concentración inhibitoria del 50% de la población.

IARC: Agencia internacional para investigación del Cáncer.

IL: Interleucinas.

MCF-7: Línea celular tumoral de cáncer de mama.

MTS: (3 - (4.5-di-metiltiazol-2-il) -5 - (3-carboximetoxifenil) - 2 - (4- sulfofenil) -2H-tetrazolio).

MTT: 3- (4.5-dimetiltiazol-2-il) -2.5-difeniltetrazolio bromuro.

NADH: Nicotinamida adenina di nucleótido.

NADPH: Nicotinamida adenina di nucleótido fosfato.

PSK: Polisacárido Krestin.

PSP: Complejo polisacárido-péptido.

RKO: Línea celular tumoral de cáncer de colon.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

ZR: Línea celular tumoral de cáncer de mama.

RESUMEN

El cáncer provoca que alrededor de una quinta parte de la población de seres humanos mueran por causa de esta enfermedad, en el planeta cada año mueren entre 100 a 350 de cada 100.000 personas, por causa de esta enfermedad (Lodish et al., 2009), por ello se realizan análisis de nuevas terapias para su tratamiento, una fuente importante de metabolitos para tratamientos no invasivos es la obtención de muestras a partir de especies fúngicas. Ensayos realizados han demostrado que los metabolitos secundarios presentes en especies de Basidiomicetos presentan efectos supresores antitumorales, se realizó estudios de citotoxicidad en las líneas tumorales de cáncer de mama (MCF-7 y ZR), cáncer de colon (RKO) y astrocitoma cerebral (D-384), empleando extractos de especies fúngicas recolectadas en el cantón Saraguro (Zona Ingapirca) y en la provincia de Zamora Chinchipe (Zonas de Picuta y Campana). Los extractos de las especies con mayores niveles de actividad citotóxica estudiadas fueron: *Pycnoporus sanguineus* (1), *Trametes* sp (4) y *Collybia* sp (2).

PALABRAS CLAVES: *Cáncer, Basidiomecetos, Pycnoporus sanguineus, Trametes sp, Collybia sp, Líneas celulares.*

ABSTRACT.

Cancer causes around a quintet of deaths worldwide; in the world every year die between 100 and 350 out of every 100.000 people; due to this disease (Lodish et al., 2009), therefore there are performed analysis of new therapies for its treatment, a significant source of metabolites for non-invasive treatments is the obtaining of samples as from fungal species. Assays performed have shown that the secondary metabolites present in species of Basidiomycetes present antitumoral suppressing effects, Cytotoxicity studies were conducted in the tumor lines of breast cancer (MCF-7 and ZR), Colon cancer (RKO) and Cerebral Astrocytoma (D-384), by employing excerpts from fungal species collected in the canton of Saraguro (Ingapirca Zone) and in the province of Zamora Chinchipe (Picuta and Campana Zones). The excerpts of the species with greater levels of cytotoxic activity studied were: *Pycnoporus sanguineus* (1), *Trametes* (4) and *Collybia* (2).

KEYWORDS: Cancer, Basidiomycetes, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes* sp, *Collybia* sp, cell lines.

INTRODUCCIÓN

A lo largo del tiempo los seres humanos han dependido de la naturaleza para satisfacer sus necesidades básicas, una de las más importantes ha sido la formulación de medicamentos para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades; como el cáncer (Gordon M Cragg & Newman, 2013). No obstante los medicamentos derivados de productos naturales (plantas, hongos, algas) siguen teniendo gran importancia en el descubrimiento de nuevos fármacos, sea por la complejidad de su molécula o su interacción con el organismo al provenir de un compuesto de origen natural (Gordon M Cragg & Newman, 2013).

La terapia a base de componentes naturales se ha vuelto una solución contra este tipo de enfermedades, desde tiempos ancestrales se ha reconocido el efecto medicinal de los hongos, principalmente en culturas asiáticas e incluso que su consumo ha traído beneficios para la salud (Gueritte y Fahy 2005). Actualmente se tiene conocimiento que las estructuras de algunos fármacos anticancerígenos fueron aislados de hongos endófitos, los más conocidos son los alcaloides de la vinca, vinblastina y vincristina aislados de *Catharanthus roseus*. (Gordon M Cragg & Newman, 2009). Los hongos medicinales han mostrado acciones terapéuticas contra el desarrollo de células cancerígenas, principalmente porque presentan compuestos bioactivos, antioxidantes, a estos compuestos se los ha logrado clasificar como compuestos de alto y bajo peso molecular (Kingston, 2012).

La pared celular de los hongos es una estructura con gran plasticidad, que da la forma y protege a la célula de diferentes tipos de estrés ambiental, entre los que se destacan los cambios osmóticos, le permite controlar su permeabilidad dada su localización en la parte exterior de ella, la pared es el primer lugar de interacción con el hospedador, jugando un papel muy importante en el desarrollo de la acción patógena fúngica (Pontón, 2008). Algunos componentes de la pared son muy inmunogénicos y estimulan un gran número de respuestas celulares y humorales durante la infección. Algunos componentes de la pared celular son los β -glucanos, mananos, glicoproteínas, quitina, glucano y galactomanano (Quiñones, Miguel, & Aleixandre, 2012). La presencia de estos compuestos en los hongos ha permitido demostrar que intervienen en activación del sistema inmune, modulación de señales de traducción de rutas relacionadas con el

desarrollo del cáncer, activación de factores de transcripción que regulan la expresión de genes (Kroll, 2001).

Dentro de las sustancias que han sido encontradas de gran interés tenemos la anidulafungina que es una nueva equinocandina, como otras de su género, inhibe de manera selectiva la síntesis del 1,3-β-D-glucano, un importante componente estructural de la pared de la célula fúngica que no está presente en la de los mamíferos, lo que evita problemas de toxicidad (Gobernado & Cantón, 2008). Se tiene conocimiento que algunos extractos de hongos en la actualidad son utilizados en estudios contra el cáncer, ya que han presentado una respuesta inhibitoria en la proliferación de estas células malignas, contra este tipo de enfermedad

En la actualidad se ha descrito 140.000 especies de hongos, aunque la diversidad global no ha sido totalmente catalogada por los taxónomos. Los hongos contienen algunos de los compuestos medicinales naturales más potentes del planeta, la ciencia está familiarizada tan solo con el 10 por ciento de su población. De las cuales se han estudiado cerca de 100 especies diferentes debido a sus beneficios que promueven la salud y cerca de media docena de ellas sobresalen por su capacidad de reforzar significativamente el sistema inmunológico (Pontón, 2008)

Por lo descrito anteriormente el objetivo de este trabajo es de estudiar mediante el ensayo de MTS la actividad citotóxica de extractos fúngicos en diferentes líneas celulares de cáncer.

CAPÍTULO I
1. MARCO TEÓRICO

1.1 Cáncer.

El cáncer es una enfermedad que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo, es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua y descontrolada de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de otros tejidos (Bhanot, Sharma, & Noolvi, 2011). El cáncer puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, esta no es una enfermedad única, sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y de la célula de origen (Hanahan & Weinberg, 2011).

El cáncer conocido también como tumores malignos o neoplasias malignas, es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado y la propagación de células anormales, estas células acumulan mutaciones que resultan en respuestas defectuosas a las señales antimitogénicas lo que contribuyen a la proliferación no programada, pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, mediante el proceso conocido como metástasis (Malumbres & Barbacid, 2009; SACC, 2012; OMS, 2013). Este proceso de diseminación del cancer es complejo y largo debido a que las células cancerosas deben invadir los tejidos cercanos al órgano, luego llegar a un flujo sanguíneo o un vaso linfático para poder desplazarse a una zona del cuerpo y empezar a establecer una colonia, las fases en la producción de una metástasis son las siguientes: desprendimiento, invasión, penetración vascular, transporte intravascular, embolización con muerte celular y embolización con crecimiento.

Se tiene conocimiento que los procesos de división celular, diferenciación y muerte celular son los mismos en células normales que en tumorales, la diferencia se basa en las alteraciones de los mecanismos de control de estos procesos. Las células tumorales presentan cuatro tipos de alteraciones en sus funciones básicas: primero sus puntos de control en la proliferación celular son defectivos, produciendo células con genoma inestables que tienden a evolucionar a células cancerosas (Jiménez Medina, 2006). En segundo lugar el programa de diferenciación celular puede estar alterado, tercero la integridad cromosómica y genética resulta ser inestable, y finalmente el programa de muerte celular programado suele estar desregulado (Chabner & Longo, 2001). Para poder contener el aumento en la incidencia de tumores malignos es necesario de realizar la prevención primaria y la identificación de lesiones que tienden a ser las precursoras tumorales, además de la identificación de nuevos mecanismos, fármacos, extractos que sirvan como reguladores en los mecanismos de interacción molecular que

activan todas estas reacciones , para desarrollar nuevas terapias contra el desarrollo del cáncer (Bingham et al., 2003).

1.1.1 Antecedentes Históricos.

El cáncer no es una enfermedad nueva, tenemos conocimiento de papiros egipcios que datan de aproximadamente el año 1600 A.C. ya la describían. Se induce que fue el médico griego Hipócrates la primera persona en utilizar la palabra “carcinoma” que significa “cangrejo” para denominar el cáncer (Gonzalez, 2004). Cuando la primera autopsia fue realizada por el anatomista italiano Giovanni Morgagni en 1761, se sentaron las bases para el estudio científico del cáncer, conocida hoy en día como la Oncología.

Actualmente el cáncer es un problema de salud pública reconocido como prioritario en la mayoría de los países asociados a la Organización Mundial de la Salud, en América Latina está catalogado como una de las enfermedades con mayor incremento de las tasas de incidencia y mortalidad. En países en vías de desarrollo y tercer mundistas el cáncer es considerado como la primera causa de muerte por neoplasias malignas (Calderón et al., 2006).

El panorama actual del cáncer nos dice que, cambios demográficos, económicos y ambientales han repercutido en todos los aspectos para su desarrollo. La Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) ha estimado que el año 2002 hubieron 10.9 millones de casos nuevos de cáncer y 6.7 millones de muertes por cáncer en todo el globo terráqueo. Estas cifras representan un incremento del 22% en la incidencia y mortalidad por cáncer en comparación con las cifras del año 1990 y según la OMS el número de casos se elevará a 15 millones para el año 2020 (Santisteban, 2006).

1.1.2. Causas del Cáncer.

La mayoría de las células normales del cuerpo crecen y se dividen de forma ordenada a lo largo de su vida, cuando está a dejado de cumplir sus funciones deben de ser eliminadas o destruidas evitando la aparición de enfermedades como el cáncer, consecuencia de una replicación indiscriminadas de células dañadas. Esto ocurre cuando el crecimiento de las células está fuera de control y pasan replicándose demasiado rápido y sus procesos de división celular están descontrolados, la célula olvida como morir.(Crespi & Summers, 2005).

Existen muchos tipos diferentes de cáncer y pueden aparecer en casi cualquier órgano o tejido, como el pulmón, el colon, mama, la piel, los huesos o el tejido nervioso.

Entre las causas múltiples de cáncer tenemos:

- Benceno y otros químicos.
- Consumo excesivo de alcohol.
- Toxinas ambientales, como ciertos hongos venenosos y un tipo de tóxico que puede formarse en las plantas de cacahuete (aflatoxinas).
- Exposición excesiva a la luz solar.
- Problemas genéticos.
- Obesidad.
- Radiación.
- Virus.

Sin embargo, la causa de muchos cánceres sigue siendo desconocida, estas causas engloban tanto factores externos como internos, pudiendo actuar juntos o en secuencia para de esta forma iniciar o promover el desarrollo del cáncer, sin embargo al ser un proceso complejo que comprende múltiples etapas requiere de la acumulación de mutaciones y como resultado las células adquieren características esenciales del cáncer las cuales son: **Figura 1** (Hanahan & Weinberg, 2011).

- Conservar señales de proliferación.
- Evadir supresores de crecimiento.
- Resistencia a la muerte celular.
- Inducir Angiogénesis.
- Activa invasión y metástasis.
- Replicación Indefinida.
- Evadir la Destrucción Inmune.
- Inflamación como promotora de tumores.
- Genoma Inestable y Mutaciones.
- Desregulación Energética Celular.

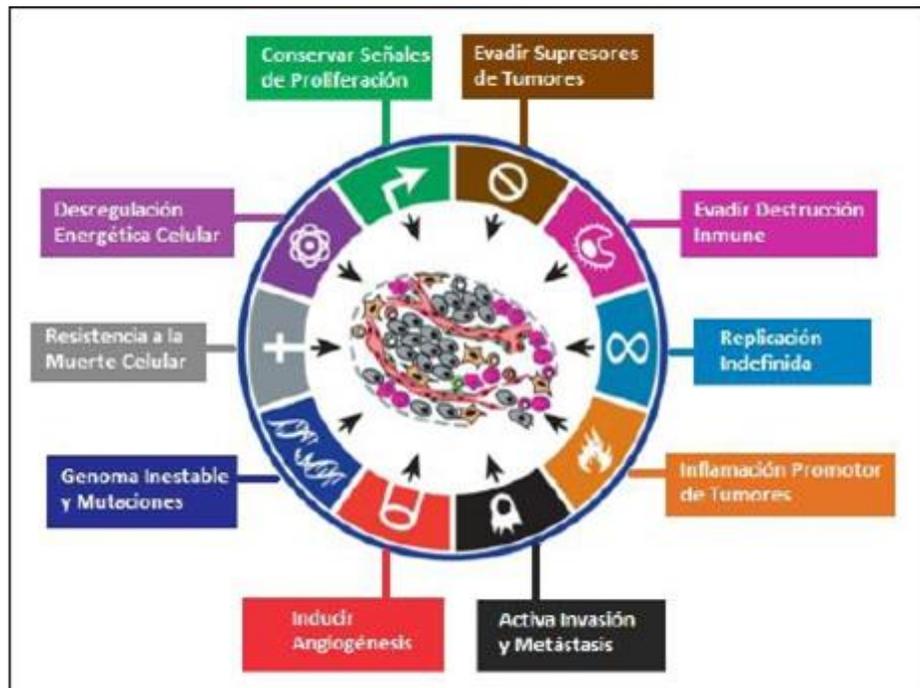


Figura 1: Características de las células cancerígenas.
Fuente: Autor. Modificado de Hanahan & Weinberg, 2011.

1.1.3. Incidencia.

A nivel mundial en el año 2012 se estimó que existió un total de 14 millones de nuevos casos de cáncer con una mortalidad de 8 millones para mujeres y hombres (Ferlay et al., 2013).

Dentro de los varios tipos de cáncer que más afectan a la población mundial en ambos sexos **Figura 2**, tenemos el cáncer de mama que afecta en un 6,4% y colonrectal en un 8,5% (Ferlay et al., 2013).

INCIDENCIA

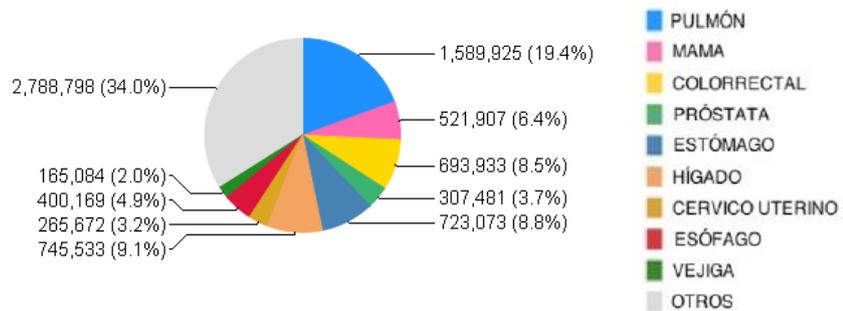


Figura 2: Índice de incidencia de cáncer en el mundo en ambos sexos.
Fuente: Autor. Modificado de (IARC, 2014).

En el 2010 se reportó que en el cantón Loja encontramos el 52% de casos de cáncer, el número para el periodo 1997-2006 es de 3.067 casos, de ellos 1.822 son mujeres representando el 59.4% y 1.245 casos son hombres representando el 40.6% (Garrido & Yunga, 2010).

1.1.4. Cáncer de Mama.

El cáncer de mama es un tipo de cáncer, que afecta más a las mujeres y con menor frecuencia a hombres, se localiza en las glándulas mamarias. Este tipo de cáncer se puede detectar tempranamente a través de la observación o el tacto. Según estadísticas del Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas de Lima, durante el presente año se registraron 1209 nuevos casos de cáncer de mama, igual porcentaje en cáncer al cuello uterino (Aguilar Ticona & Gho Daniel, 2009).

Se conocen varios factores de riesgo que favorecen la enfermedad, entre ellos:

- Envejecimiento.
- Primera menstruación a edad muy temprana (menarquia).
- Menopausia tardía.
- Tener el primer hijo a edad avanzada.
- No haber dado a luz.
- No haber amamantado.
- Tener antecedentes de familiares con esta afección.

La incidencia del cáncer de mama va en aumento en todos los países del mundo y se reconoce un incremento de 10 veces más de desarrollar este padecimiento en las regiones con mayor y menor incidencia de este cáncer. Según la regionalización de IARC, la tasa más alta en 2002 procede de Sudamérica con 46%, seguida por El Caribe con 32.9% y Centroamérica con 25.9% por 100.000 mujeres. La tasa más baja se registró en Haití con 4.4% casos por 100.000 mujeres, lo cual contrasta con los países del cono sur donde la incidencia es de 75% y 83% por 100.000 mujeres en Argentina y Uruguay respectivamente, que son similares a las observadas en Estados Unidos de América y Canadá.(Lozano Ascencio, Gómez Dantés, Lewis, Torres Sánchez, & López Carrillo, 2009).

1.1.5. Cáncer de Colorectal.

El cáncer colorectal es un término que se emplea para el cáncer que se origina en el colon o el recto. A estos cánceres se les puede llamar por separado cáncer de colon o cáncer de recto (rectal) dependiendo del lugar donde se origina. Tanto el cáncer de colon como el cáncer de recto comparten muchas características en común. Casi todos los cánceres de colon empiezan en el revestimiento del colon y recto.

Al igual que en la mayoría de canceres, no se conoce las causas que los ocasionan, pero los factores que aumentan el riesgo de padecerlo (The American Cancer Society, 2014), son los siguientes:

- Ciertos tipos de alimento, como el consumo de carnes rojas.
- Inactividad física.
- Obesidad.
- Tabaquismo.
- Edad.
- Antecedentes familiares, síndrome hereditarios, entre otros.

La tasa de mortalidad a nivel mundial es más elevada en países desarrollados y disminuye en países subdesarrollados, así mismo es más elevado en mujeres en comparación a los hombres, 9 % y 8 % respectivamente (Ferlay et al., 2013).

1.1.6. Astrocitoma Cerebral.

El término “Glioma” se utiliza de forma general para cualquier tumor que surja en el tejido conjuntivo o “pegajoso” del cerebro. Este tejido, llamado glía, ayuda a mantener en su lugar y en buen funcionamiento a las neuronas (“células que piensan”)(Gomes & Colquhoun, 2012). Hay tres tipos de células gliales normales de las que se pueden generar tumores como son:

- Astrocito (célula en forma de estrella) generará astrocitomas (incluyendo a los glioblastomas).
- Oligodendrocito (célula con brazos cortos que forma el aislamiento de las neuronas) generará oligodendrogliomas.
- Ependimarias (células que conforman el recubrimiento de las cavidades de fluido en el cerebro) generará ependimomas.

Los astrocitomas pueden aparecer en varias partes del cerebro y del sistema nervioso, incluyendo el cerebelo, las áreas centrales del cerebro, el tronco cerebral, y la médula espinal (ABTA, 2002).

Las terapias actuales para los astrocitomas, incluyen cirugía, radiación y quimioterapia, los cuales no han tenido éxito debido al rápido crecimiento del tumor invasivo, la heterogeneidad genética y una mala comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la manifestación de la enfermedad y la progresión (Sarica et al., 2012).

1.2. Tratamiento.

Con el avance de la tecnología y a medida que pasan los años se ha logrado combatir con gran efectividad este problema que afecta a gran parte de la población.

En resumen el tratamiento moderno del cáncer debe considerar:

- Lugares de trabajo especializado, la improvisación es un enemigo letal de esta enfermedad (Centro de Cáncer).
- Educación continua de los profesionales que trabajan en cáncer.
- Investigación.
- Políticas de prevención, diagnóstico precoz, y educación a la comunidad.
- Tratamientos multidisciplinarios.

- Los comités oncológicos se transforman en el corazón de la estrategia terapéutica para tratamientos curativos y paliativos.
- Protocolización de terapias.
- Rehabilitación especializada. Incorporación de tratamientos complementarios validados, como yoga, musicoterapia, arteterapia, meditación, espiritualidad, reiki, entre otros.
- Cirugía especializada en tratamientos curativos, reconstrucción y tratamientos paliativos.
- Oncología médica especializada.
- Comités oncológicos, comités de rehabilitación, comités éticos.
- Patología, estudios moleculares, estudios genéticos.
- Tecnología acorde a terapias modernas.
- Radioterapia tecnológicamente adecuada y participativa.
- Servicios y cuidados paliativos que permitan el manejo del dolor, la humanización de los tratamientos de los pacientes y sus familiares.
- Soporte social.
- Políticas que ayuden y protejan a los pacientes con cáncer o pacientes que tengan riesgo.
- Redes de apoyo familiar, laboral y social.
- Soporte económico (en la actualidad seguros y fundaciones).
- Personal de enfermería especializado y humanizado.
- Sistemas de químico farmacéuticos integrados a centros de cáncer.
- Sistemas de recepción, educación, contención, seguimiento y apoyo de pacientes y familiares.
- Unidades de gestión que permitan el manejo de cánceres de alta frecuencia o alto impacto (Centro de mama, Centro de tiroides, Centro de melanoma, Centro de colon, etc).

El cáncer aumenta cada vez más en el mundo. Debemos estar organizados para prevenirlo, detectarlo y combatirlo. La organización de centros modernos de cáncer permite mejores tratamientos, mejor organización, mejor gestión, y mejores tasas de curación, rehabilitación, reinserción, paliación, calidad de vida y apoyo a los pacientes con cáncer (Capdeville, Salas, Kleiman, & Cadiz, 2015).

1.2.1. Quimioterapia.

Es el uso de medicamentos para destruir bacterias, virus, hongos y células cancerosas. Con mayor frecuencia, el término se usa para referirse a los medicamentos para combatir el cáncer. Los medicamentos viajan a través de todo el cuerpo para llegar hasta las células cancerígenas, con la finalidad de inhibir su diseminación y por lo tanto la metástasis. En la actualidad se usan más de 100 medicamentos de quimioterapia, ya sea solos o en combinación con otros medicamentos o tratamientos. Conforme continúan las investigaciones, se espera que haya más medicamentos disponibles, estos varían ampliamente en su composición química, vía de administración, utilidad en el tratamiento y efectos secundarios (Myrland, 2009). Los quimioterapéuticos presentan efecto principalmente en células en proliferación, la problemática que se presenta se debe a que estos medicamentos no pueden detectar la diferencia entre células de los tejidos normales y las células del cáncer, con lo cual se ven afectadas ambas, en especial en aquellas células que tienen alta tasa de replicación, causando efectos secundarios como anemia, pérdida de cabello, pérdida de apetito, náuseas, vomito, y demás (Coeffic, Antoine, & Khayat, 2002).

1.2.2. Antineoplásicos de origen fúngico.

Al poseer una gran cantidad y variedad de especies los hongos son un grupo taxonómico diferente de las plantas y animales el cual es conocido como Reino Fungí. Posee en su estructura microscópica hifas, en su carácter perenne y en sus procesos de reproducción a través de esporas sexuales y asexuales (Alexopoulos, Mins, & Blackwell, 1996, Guzman, 2004). La clasificación actual de este reino, se basa en las relaciones evolutivas de los grupos de organismos correspondientes a linajes monofiléticos y se incluyen en cuatro familias: Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota y Basidiomycota (Alexopoulos et al., 1996) Los hongos se cuentan entre los organismos más importantes del mundo, no solamente por su papel vital en el funcionamiento del ecosistema, sino también por su influencia en los humanos y en actividades relacionadas con él. También son esenciales en la descomposición, reciclamiento y transporte de nutrientes y son indispensables para el desarrollo sostenible del ambiente (L. Robles, Huerta, Andrade, & Ángeles, 2007).

Pese a los importantes avances científicos y tecnológicos en la química combinatoria, los medicamentos derivados de productos naturales siguen teniendo una enorme contribución al descubrimiento de fármacos, debido a la complejidad y la diversidad

molecular que estos tienen, además presentan la característica de que a menudo poseen actividades biológicas altamente selectivas y específicas basadas en su mecanismos de acción (Gordon M Cragg & Newman, 2013).

En la actualidad se busca un adelanto en cuanto a la terapia contra el cáncer comprendiendo mejor los mecanismos que conducen a la transformación y la proliferación celular así como también combinando los conocimientos de cómo actúan los productos naturales directamente con la comprensión del ciclo celular y los mecanismos de apoptosis, lo que ha permitido identificar dianas contra las que se están desarrollando nuevos antineoplásicos (Golias, Charalabopoulos, & Charalabopoulos, 2004).

Aparte de lo mencionado anteriormente hay que tomar en cuenta que los productos naturales se adaptan perfectamente a la aproximación molecular actual de desarrollo de fármacos, ya que individualmente inhiben múltiples aspectos de la proliferación de células cancerosas y como grupo muestran afinidad para la interacción sinérgica (Geetha, Nair, Latha, & Remani, 2012).

1.2.2.1 Hongos Basidomicetos.

Los basidiomicetos son hongos más desarrollados, con más de 30.000 especies (Brizuela et al., 1998), constituyen el segundo grupo en importancia entre los hongos superiores que se caracterizan por tener núcleo dicariótico. Estos comprenden especies medicinales y comestibles, puesto que contienen proteínas de alta calidad y muchas sustancias bioactivas con efectos inmunomodulatorio y antitumorales (Ladio, 2005). La división Basidiomycota alberga las clases: *Teliomycotina*, *Ustilaginomycotina* y *Hymenomycotina*.

De los 5.1 millones de especies de hongos estimados por estudios recientes basados en métodos moleculares; 14.000 forman cuerpos de fructificación visibles, de estos se calcula que más de 3.000 pueden ser consideradas especies comestibles y 1.800 especies con propiedades medicinales (Ladio, 2005).

Los hongos cumplen un papel muy importante en la descomposición de la materia orgánica, la gran mayoría de las especies forman una estructura macroscópica, con hifas modificadas que dan origen a pseudo-tejidos denominado cuerpo fructífero, se diferencian de otros hongos por producir esporas llamadas basidioesporas en una estructura microscópica llamada basidio (Fortún et al., 2011). Algunos basidiomicetos

pueden formar una estructura de resistencia en condiciones desfavorables que puede estar latente durante largos períodos, ésta estructura se denomina esclerocio (Alexopoulos et al., 1996). El micelio se compone de hifas bien desarrolladas que permiten absorber nutrientes. Individualmente, las hifas son microscópicas, pero pueden ser vistas formando la masa de micelios. El color del micelio es generalmente blanco, pero también se observan de color amarillo, naranja, café y negro (Cortez, Baseia, & Mara, 2008).

Nutricionalmente los hongos comestibles contienen proteína de alta calidad por lo que son buena fuente de grasa, fosforo, hierro y vitaminas (tiamina, riovflavina, ácido ascórbico, ergosterol y niacina) por ello contribuyen en el aspecto medicinal; además poseen sustancias como polisacáridos, glicoproteínas, triterpenoides, esteroides y ácidos nucleicos y un grupo particular de proteínas fúngicas inmunomodulatorias (FIPS) las cuales son conocidas como sustancias funcionales, nutraceúticas o nutraceuticas y tienen un rol en la prevención y supresión de enfermedades (Rendón Hernández, 2015).

1.2.2.2 Importancia.

Algunas especies de interés del reino fungí en especial los basidiomicetos constituyen una clase de hongos cuyo metabolismo y capacidad de producción poseen una gran importancia en la actualidad, debido a que, sus cuerpos fructíferos poseen un gran valor económico por ser una fuente de alimentación humana y son especialmente apreciadas los ejemplares obtenidos por recolección en los bosques y praderas por su delicado sabor, además de que es posible cosechar algunas especies en grandes cantidades por medio de cultivos a escala industrial (Herrera & Ulloa, 1990).

La importancia radica en su metabolismo secundario como es el claro ejemplo de los basidiomicetos el cual es rico en terpenoides, especialmente sesquiterpenoides por lo que varias especies de estos hongos se extraen sustancias que tienen diversos usos en la industria y en la medicina (Brizuela, García, Pérez, & Mansur, 1998), estas sustancias constituyen fuentes naturales potenciales de componentes bioactivos y han motivado en las últimas décadas el interés en estudiar estos organismos, llegando a producir una amplia gama de productos naturales que abarca desde componentes estructurales con actividad antitumoral e inmunológicamente activos hasta agentes antimicrobianos, anti fúngicos, antivirales, citostáticos, enzimas, reguladores de crecimiento y aromas (Brizuela et al., 1998).

Al ser este un punto muy importante ya que existen especies de hongos con distintos metabolismos secundarios es necesario el estudio de los productos del mismo por lo que resulta conveniente profundizar en el cultivo y manejo de estos microorganismos, con el fin de identificar metabolitos nuevos y útiles al hombre.

1.2.2.3 *Pycnoporus sanguineus*.

Pertenece a la familia Polyporaceae la cual abarca no solo los hongos más fuertemente ligninolíticos sino los más eficientes degradadores de madera, su taxonomía se ve descrita en la Figura 3, es un hongo saprofito, presenta un color anaranjado intenso, se lo localiza en ambientes naturales, zonas tropicales y húmedas, su color intenso se le atribuye a compuestos como: cinnabarina, tramesanguina y ácido cinabarínico los cuales presentan actividad antibiótica y antiviral (Papinutti, 2013) posee un potencial biotecnológico al realizar síntesis de enzimas como tirosinasas, lacasas, quinasas, invertasas, potencial farmacéutico, ayuda a mitigar el impacto producido en la piel por plantas como la hiedra venenosa, este hongo ha sido tabulado como no comestible por propiedades antes mencionadas (Lomascolo, Uzan-Boukhris, Herpoël-Gimbert, Sigoillot, & Lesage-Meessen, 2011).



Figura 3: Taxonomía de *Pycnoporus sanguineus*.

Fuente: (Papinutti, 2013).

1.2.2.4 *Trametes* sp.

Pertenece a la familia Polyporaceae, su taxonomía esta descrita en la Figura 4, una de las propiedades de los hongos del género *Trametes* sp, es la degradación de la lignina para facilitar la digestión de la celulosa y entre las enzimas que emplean estos hongos para ese fin se encuentran las llamadas lacasas, es una especie que fructifica sobre madera de árboles planifolios, coníferas, e incluso sobre algunos frutales

provocando en el árbol una podredumbre blanca (Becerra & Robles, 2012). Se ha justificado que el género *Trametes* sp tiene 64 especies de las cuales *Trametes versicolor* y *Trametes hirsuta* son las que mayor beneficio han presentado en la biotecnología del papel como farmacéutica (Azpeitia et al., 2013). Esta especie común que puebla nuestros bosques tiene importantes usos medicinales, se ha comprobado su eficacia en el tratamiento de diversos tipos de cáncer producidos por el papiloma humano, como el cáncer de útero, además ayudan a minimizar los efectos de la quimioterapia en el ser humano.

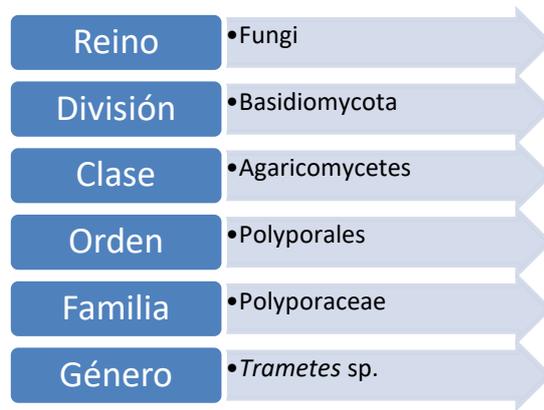


Figura 4: Taxonomía de *Trametes* sp.

Fuente: (J. D. Toledo, 2011)

1.2.2.4 *Collybia* sp.

Este tipo de hongo es considerado un saprofito perteneciendo a la división de los basidiomycota en la Figura 5, se puede observar su taxonomía, esta especie crece normalmente bajo pinos, por lo que se lo cataloga como un descomponedor de coníferas, al igual que los mismo de su clase presenta un sombrero característico (Marcatoma, 2014) su habitad puede ser en solitario o en pequeños grupos, se desarrollan en suelos que contengan alto contenido de materia orgánica. Sus características y tamaño difieren entre especies de su mismo género esta especie es clasificada como no comestible para el ser humano, pueden tener un píleo anaranjado de 3 a 4 cm de diámetro, laminas gruesas, muy separadas entre sí, del mismo color que el píleo, hueco, fibroso, de 5-6 cm de longitud.

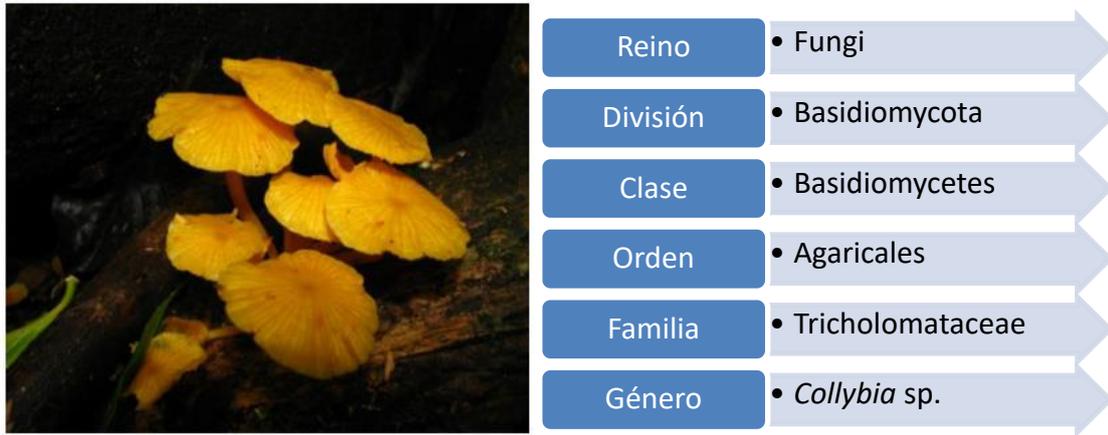


Figura 5: Taxonomía de *Collybia* sp.
Fuente: (J. D. Toledo, 2011).

1.2.3. Extractos de material fúngico.

Los extractos fúngicos, pueden ser obtenidos de acuerdo a técnicas de extracción continua por maceración, utilizando disolventes de polaridad como: hexano, metanol, acetato y etanol al 95%, maceración continua y concentrados en un evaporador rotatorio a temperaturas controladas (<45°C). Extractos acuosos se los obtiene preparando una infusión, suspensión de una sustancia orgánica en líquidos calientes para poder disolver las partes solubles, para posteriormente realizar el filtrado y obtención del extracto (Belloso, González, Suárez, & Cáceres, 2015).

1.2.3.1 Obtención de Extractos con Solvente.

Se debe tener presente que para poder obtener los extractos necesarios se debe considerar parámetros importantes como son; selección del disolvente, selección de la relación material fúngico-solvente, cinética de la extracción (Rivero Martínez et al., 2002). La obtención de extractos fúngicos con solventes consiste en la obtención de los principios activos de los hongos al ponerlos en contacto con el solvente o mezcla de ellos, el cual tiene las características de extraer dichos principios del hongo.

Una de las técnicas más utilizadas para la obtención de los extractos es la maceración la cual puede ser simple o fraccionada, esta técnica se basa en poner en contacto duradero a la muestra con el solvente, se debe realizar agitaciones frecuentes a lo largo de varios días, tratando de influenciar el gradiente de concentración. Este gradiente empieza en su pico más alto en el primer día pero con el transcurso del tiempo va disminuyendo, como norma se debe dejar macerar por siete días con agitación,

protegido de la luz solar y en equipos o recipientes cerrados (Rivero Martínez et al., 2002).

Para poder realizar la extracción del material fúngico, se debe proceder a la elección del disolvente y esto puede depender de parámetros técnicos y económicos; selectividad, estabilidad, inercia química, temperatura de ebullición no muy elevada para permitir su eliminación total, seguridad de manipulación que no sea muy tóxico ni inflamable (González, 2004). Se debe tener en consideración la solubilidad de los diferentes componentes presentes en los extractos fúngicos para que puedan interactuar y ser aislados respectivamente los disolventes más utilizados son los hidrocarburos alifáticos: éter de petróleo, hexano, y también el propano y butano líquido (a presión). Aunque el benceno es un buen disolvente, solo que su toxicidad limita cada vez más su utilización. Igualmente sea recurrido a otros disolventes halogenados y al etanol, no obstante se pueden utilizar otros solventes como soluciones ácidas o alcalinas para la extracción selectiva de algunos compuestos, pero se debe tener precaución con el pH de las mezclas para prevenir hidrólisis o reordenamiento de compuestos sensibles (J. Robles, 2000).

Aunque se tiene conocimiento que el agua es uno de los solventes más utilizados y su uso puede ser realizado de tres formas distintas: destilación con agua; el extracto fúngico es sumergido totalmente en agua y se somete a ebullición útil para materiales que tienden al apelmazamiento (cuerpo fructífero del hongo). Destilación con agua y vapor; el material fúngico no está en contacto con el agua, el vapor de agua se inyecta a través de la masa fúngica dispuesta sobre placas perforadas. Destilación con vapor seco o sobrecalentado; se impulsa el vapor a través de la masa es colocada sobre columnas, aumentando la cantidad de extracto a obtener (González, 2004).

Cuando se ha obtenido el extracto fúngico, este es filtrado, pero se debe tener en consideración que a partir de un mismo hongo se pueden obtener extractos diferentes con principios variados, lo importante es saber la parte del cuerpo del hongo que se emplea (Schwabe, Nader, & Pruessner, 2014). El extracto obtenido es llevado a rota vapor, esta técnica nos va a permitir recuperar el solvente utilizado y separarlo del extracto fúngico deseado (Al-Fatimi, Jülich, Jansen, & Lindequist, 2006).

1.3 Viabilidad y toxicidad celular.

La citotoxicidad celular se define como una alteración de funciones celulares básicas que con lleva a un daño que puede ser detectado, diferentes autores han desarrollado

baterías de pruebas *in vitro* para predecir los efectos tóxicos de drogas y compuestos químicos, utilizando como modelos experimentales cultivos primarios y órganos aislados como línea celulares establecidas. Los ensayos de citotoxicidad son ampliamente utilizados para la detección de distintos compuestos citotóxicos que son de interés terapéutico, uno de estos ensayos es el 3-(2,5-difenil-2-tetrazolio)metil-2,5-difeniltetrazolio o MTS, este ensayo mide el potencial de la reducción de la célula usando una reacción colorimétrica, las células viables reducirán el reactivo MTS a un producto de formazano coloreado (Freshney, 2011).

Entre otros ensayos para medir la citotoxicidad que son: fiables, sensibles y cuantitativos que permiten el análisis de un gran número de compuestos en investigación preclínica, está aumentando. Este tipo de ensayos son capaces de detectar mediante diferentes mecanismos celulares conocidos. Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Kendig & Tarloff, 2007).

Dentro de los ensayos más conocidos y ya validados se encuentran:

- Ensayo de captación del rojo neutro.
- Enlazamiento al azul de kenacid (cuantificación de proteínas).
- Ensayo de reducción del Bromuro de 3-(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).
- Prueba de proliferación celular con Azul tripan.
- Ensayo para el índice mitótico.

1.3.1 Determinación de Viabilidad mediante ensayo MTS.

Dentro de los ensayos más utilizados para la determinación de viabilidad celular, tenemos el MTS el cual se basa en la reducción de la sal de tetrazolio, y es ampliamente utilizada para medir citotoxicidad celular (Freshney, 2011).

El compuesto de tetrazolio MTS es biorreducido por las células en un producto de formazán coloreado que es soluble en un medio de cultivo, esta conversión se lleva a cabo presumiblemente por NADPH o NADH producido por las enzimas deshidrogenasas en células metabólicamente activas (Berridge & Tan, 1993).

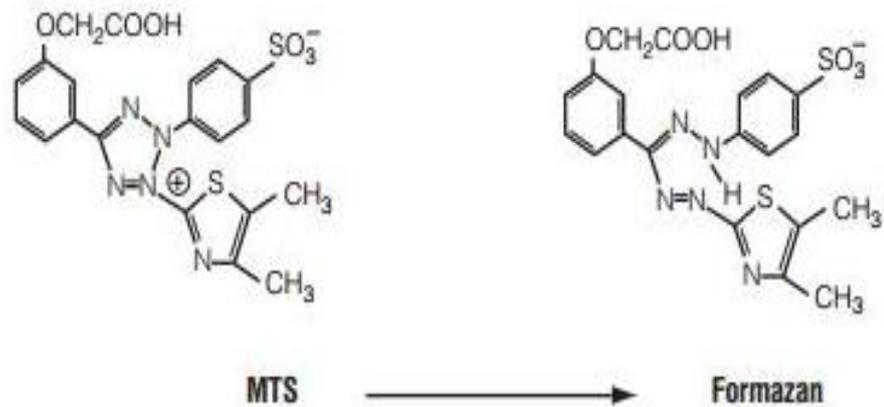


Figura 6: Transformación del compuesto MTS a formazan.
Fuente: Promega, 2012.

Dentro de las ventajas de este ensayo están:

- Fácil de usar ya que solo se le añade el reactivo a las células se incuba y se lee la absorbancia.
- Práctico porque se suministra como una solución única, esterilizada por filtración y listo para añadir a las placas de ensayo.
- Rápido porque se lo puede realizar en placas de 96 pocillos sin lavado o recolección de células, además elimina los pasos de solubilización.
- No radiactivo, no necesita de compuestos para eliminar residuos radioactivos.
- Flexible las placas pueden ser leídas y devueltas a la incubadora para un mayor desarrollo de color.
- Seguro no requiere ningún disolvente orgánico volátil para solubilizar el producto de formazan (Promega, 2012).

**CAPÍTULO II.
FIN DEL PROYECTO**

2.1. Objetivo General:

- Determinar la actividad citotóxica de algunos extractos de especies de hongos que se encuentran en la región sur del país: *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes* sp, *Collybia* sp, sobre líneas celulares de cáncer de mama, cáncer de colon y astrocitoma cerebral.

2.2. Objetivos Específicos:

- Evaluar si los extractos fúngicos de *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes* sp, *Collybia* sp, presentan actividad citotóxica contra líneas celulares humanas de cáncer.
- Establecer el porcentaje de inhibición de extractos fúngicos en 4 líneas tumorales humanas.
- Realizar el análisis sobre cual línea celular se presenta mayor efecto citotóxico.
- Analizar cuál de los tres extractos fúngicos presento mayor actividad citotóxica.

**CAPÍTULO III.
METODOLOGÍA**

3.1 Material Fúngico.

El lugar de procedencia de las especies de hongos fueron de las zonas del cantón Saraguro y de la provincia de Zamora Chinchipe como se observa: en la **Figura 7** ubicación de las zonas de muestreo, en la **Tabla 1** se observa el nombre de las especies fúngicas recolectadas para ser maceradas y analizadas posteriormente. Algunas muestras de la misma especie difieren del sitio de recolección o estado de maduración.

Las especies fúngicas fueron clasificadas taxonómicamente por el PhD Dario Cruz y registradas en la base de datos del fungario del Departamento de Biología Aplicada.

3.2 Obtención de Extractos.

Los extractos fueron donados por el Mgs. José miguel Andrade del Departamento de Química Aplicada de la Universidad Técnica Particular de Loja. Los extractos se obtuvieron por la técnica de maceración estática mediante acetato de etilo.

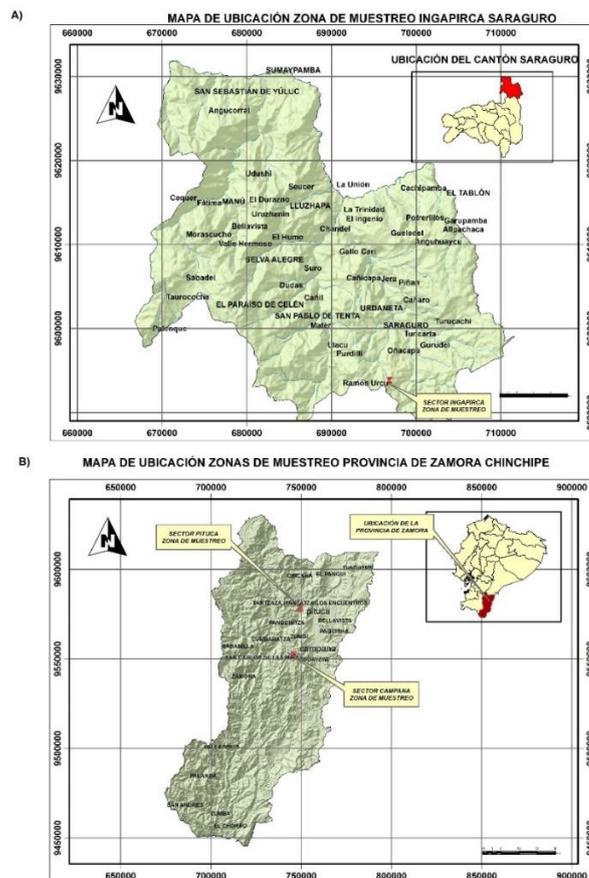


Figura 7: Mapas de ubicación correspondientes a las zonas de muestreo: A) Ingapirca (Saraguro), B) Pituca y Campana (Zamora Chinchipe).

Fuente: Autor.

Los extractos de los hongos fueron disueltos en medio base RPMI y DMSO a una solución madre de 10.000 µg /ml. Para posteriormente trabajar a una concentración de 1.000 µg/mL, y llevados a refrigeración hasta el momento de realizar el test.

Tabla 1: Lista y nombres de especies fúngicas recolectadas en el sector Ingapirca del cantón Saraguro y en la provincia de Zamora Chinchipe sector de Picuta y Campana.

Orden	Familia	Especie	Sitio recolección	Ecología-Geografía
Agaricales	Agaricaceae	<i>Coprinus sp.</i>	Campana.	Bosque Húmedo tropical.
	Auriscalpiaceae	<i>Lentinellus sp.</i>		
	Omphalotaceae	<i>Lentinula sp.</i>	Saraguro.	Bosque Montano Alto.
	Pleurotaceae	<i>Pleurotus djamor.</i>	Picuta.	Bosque Húmedo tropical.
	Schizophyllaceae	<i>Schizophyllum commune.</i>		
	Marasmiaceae	<i>Tetrapyrgos sp.</i>	Campana.	Bosque Húmedo tropical.
	Strophariaceae	<i>Tricholoma sp.</i>	Saraguro.	Bosque Montano Alto.
	Tricholomataceae	<i>Collybia sp. (1)</i> Collybia sp. (2)		
Auriculariales	Auriculariaceae	<i>Auricularia sp.</i>	Picuta.	Bosque Húmedo tropical.
		<i>Auricularia sp. 1</i>		
Cantharellales	Clavulinaceae	<i>Clavulina sp.</i>	Saraguro	Bosque Montano Alto.
Hymenochaetales	Polyporaceae	<i>Trichaptum sp.</i>		
Polyporales	Fomitopsidaceae	<i>Fomitopsis sp.</i>	Picuta.	Bosque Húmedo tropical.
	Polyporaceae	<i>Lentinus crinitus. (1)</i>		
		<i>Lentinus crinitus. (2)</i>		
		<i>Lentinus crinitus. (3)</i>		
		<i>Lentinus crinitus. (4)</i>		
		<i>Lenzites sp.</i>		
		<i>Polyporus sp.</i>	Saraguro	Bosque Montano Alto.
	<i>Pycnoporus sanguineus.</i>	Picuta.	Bosque Húmedo tropical.	
	Pycnoporus sanguineus 1			
	<i>Trametes sp. (1)</i>	Saraguro.	Bosque Montano Alto.	
	<i>Trametes sp. (2)</i>			
<i>Trametes sp. (3)</i>				
Trametes sp. (4)				
Thelephorales	Bankeraceae	<i>Hydnellum sp.</i>	Picuta.	Bosque Húmedo tropical.

Clasificación de las muestras recolectadas, lugar de procedencia, zona de recolección.

Fuente: PhD. Darío Cruz.

3.3 Modelos Biológicos.

Para determinar el efecto citotóxico de los extractos fúngicos estudiados, se realizó el ensayo MTS, obteniendo el porcentaje de inhibición, se utilizó líneas celulares tumorales: RKO (Cáncer de colon), D-384 (Astrocitoma Cerebral), MCF-7 (Cáncer de mama) y ZR (Cáncer de mama), estas se pueden observar en la Figura 8. La línea celular RKO es un modelo biológico de tejido epitelial que se extrae de carcinoma de colon humano (ATCC); la línea celular D-384 un modelo biológico epitelial que se extrae de astrocitoma cerebral humano (ATCC), MCF-7 es un modelo biológico epitelial que se extrae de adecarcinoma de glándula mamaria (ATCC), ZR es un modelo biológico que se extrae de los conductos de carcinoma de la glándula mamaria.

Los modelos biológicos utilizados fueron proporcionados por el laboratorio de Biología Celular y Genotoxicología (LBCGT) de la Universidad Técnica Particular de Loja.

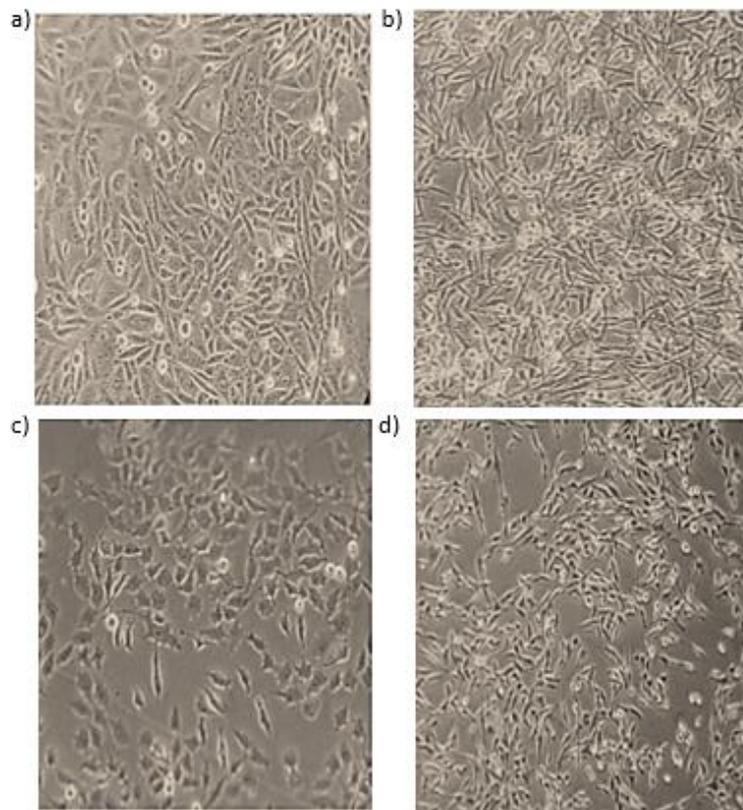


Figura 8: Líneas celulares tumorales. a) Línea celular MCF-7, cáncer de mama. b) Línea celular ZR, cáncer de mama. c) Línea celular RKO, cáncer de colon. d) Línea celular D-384, astrocitoma cerebral.

Fuente: Autor.

3.4 Cultivos Celulares.

Las líneas celulares tumorales crio preservadas fueron primeramente descongeladas posteriormente mantenidas a 37°C, 5% de CO₂ en atmósfera húmeda durante 24 horas o más, esto dependiendo de la adaptación de cada línea celular y su respectivo tiempo de replicación, el medio que fue utilizado es RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO), 1% de antibiótico-antimicótico (GIBCO) y 1% de L-Glutamina (200 mM) (GIBCO), hasta alcanzar una confluencia del 80%.

3.5 Ensayo MTS.

El ensayo consta de los siguientes procesos:

- a. **Siembra:** El número de células sembradas fue ajustada de acuerdo con el tiempo de duplicación de cada línea celular. Las líneas celulares MCF-7 y RKO se replican cada 24 horas por lo tanto se sembró 3×10^3 (cell \times ml \times pocillo), mientras que las D-384 y ZR se replican cada 16 horas, se sembró 2×10^3 (cell \times ml \times pocillo); previamente a la siembra se realizó una suspensión celular con la cantidad de células requeridas para el ensayo más el medio suplementado requerido, de dicha suspensión se sembró 100 μ L en microplacas de 96 pozos, posteriormente se incubaron por 24 horas a 37 °C en atmosfera húmeda y 5% de CO₂.
- b. **Tratamiento:** Al terminar el tiempo de la incubación, se procedió a retirar el medio de cada uno de los pocillos y se adicionó 100 μ g/ml del extracto fúngico, para establecer la IC₅₀ se probó en diferentes concentraciones (1, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 100 μ g/ml), estos fueron llevados a incubación bajo las condiciones antes mencionadas por un lapso de 48 horas. Para los controles de cada uno de los ensayos realizados se utilizó; como control positivo Doxorubicina (Dox) a 0,5 μ M y como control negativo Dimetil-Sulfoxido (DMSO) al 0,5% y un blanco respectivo.
- c. **Análisis de Resultados:** Una vez terminadas las 48 horas de incubación se adicionó 20 μ L de solución de MTS y nuevamente se incubó por un lapso de 2 horas, las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro (Model Sunrise Tecan) con una longitud de onda de 492 nm y una agitación de 5 segundos, todo esto con el fin de medir cuantitativamente la capacidad de las células para biorreducir el compuesto de tetrazolio (MTS) a una sal de formazán de color azul-morado.

Con los resultados obtenidos se determinó si existe algún efecto citotóxico de los extractos en estudios sobre las diferentes líneas celulares tumorales mediante comparación con el control de DMSO.

Con los datos de absorbancias obtenidas se realizan los siguientes cálculos para determinar la viabilidad celular mediante la siguiente ecuación:

$$\% V = [(A-B) \times 100] / C-B$$

% V = Porcentaje de viabilidad.

A = Absorbancia.

B = Blanco.

C = Control negativo.

El porcentaje de inhibición es la cantidad de células que detienen el proceso de proliferación, para poder determinar este porcentaje se toma un total de 100% de viabilidad celular al control negativo, con respecto a este se determina la cantidad de células que han sido inhibidas por los extractos analizados y se mide la citotoxicidad de los mismos.

Para calcular el porcentaje de inhibición celular se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% I = [(100 - \% V)]$$

% I = Porcentaje de inhibición celular

% V = Absorbancia

3.6 Análisis Estadístico.

Para cada una de las pruebas se realizó dos ensayos por línea celular, cada uno de estos por triplicado y bajo las mismas condiciones, todos los datos se expresaron como la media \pm desviación estándar de cada ensayo, las absorbancias obtenidas de cada uno de los extractos sobre las líneas celulares tumorales en el ensayo MTS se utilizaron para determinar la citotoxicidad de cada extracto. Se considera como efectivos los valores $> 30\%$ del porcentaje de inhibición en más de una línea celular. Se calculó el IC_{50} concentración inhibitoria 50, mediante una regresión no lineal en el programa GraphPad Prisma® 5.0.

**CAPÍTULO IV.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

4.1. Evaluación del porcentaje de viabilidad de los extractos fúngicos.

El objetivo principal de esta investigación fue determinar si algunos de los extractos fúngicos presentaban actividad inhibitoria sobre las líneas celulares aplicadas en un estudio *in vitro*, este efecto fue valorado mediante la utilización del ensayo colorimétrico MTS. Se expusieron las líneas celulares MCF-7, RKO, D-384, ZR a los diferentes extractos los cuales fueron estandarizados a una concentración de 100 µg/ml para ser analizados, los valores de viabilidad mayores al 70% son considerados con poca acción antitumoral motivo por el cual serán descartados para próximos análisis.

En la Tabla 2 se detalla el porcentaje de viabilidad de las líneas celulares MCF-7, RKO, D-384 y ZR expuestas a los diferentes extractos.

Tabla 2. Porcentaje de viabilidad de extractos fúngicos a una concentración de (100 µg/mL), ± E.E sobre líneas celulares MCF-7, RKO, D-384 y ZR.

FAMILIA	ESPECIE	MCF-7	RKO	D-384	ZR
		% VB. ± E.E			
Agaricaceae.	<i>Coprinus</i> sp.	SA	SA	67.08 ± 17.34	90.71 ± 5.73
Auriculariaceae.	<i>Auricularia</i> sp.	SA	75.39 ± 14.65	51.33 ± 16.17	67.72 ± 2.37
	<i>Auricularia</i> sp. (1)	SA	72.80 ± 6.71	26.71 ± 8.22	76.62 ± 7.14
Auriscalpiaceae.	<i>Lentinellus</i> sp.	SA	SA	96.81 ± 5.30	98.17 ± 5.15
Bankeraceae.	<i>Hydnellum</i> sp.	78.86 ± 11.68	88.16 ± 7.36	61.62 ± 2.47	92.33 ± 4.41
Clavulinaceae.	<i>Clavulina</i> sp.	70.46 ± 1.76	SA	SA	85.08 ± 1.72
Fomitopsidaceae.	<i>Fomitopsis</i> sp.	SA	SA	70.35 ± 14.70	SA
Marasmiaceae.	<i>Tetrapyrgos</i> sp.	66.30 ± 4.32	65.82 ± 3.61	40.93 ± 10.33	78.17 ± 1.59
Omphalotaceae.	<i>Lentinula</i> sp.	86.62 ± 5.94	SA	55.93 ± 6.81	93.19 ± 4.20
Pleurotaceae.	<i>Pleurotus djamor.</i>	87.17 ± 2.51	85.04 ± 5.21	44.40 ± 1.48	85.26 ± 2.30
Polyporaceae.	<i>Lentinus crinitus</i> (1)	81.47 ± 8.72	52.80 ± 4.39	20.81 ± 3.43	55.95 ± 1.68
	<i>Lentinus crinitus</i> (2)	75.14 ± 2.96	73.34 ± 7.70	28.25 ± 5.47	74.39 ± 1.31
	<i>Lentinus crinitus</i> (3)	76.88 ± 2.80	56.94 ± 4.17	35.62 ± 6.57	71.95 ± 4.47
	<i>Lentinus crinitus</i> (4)	84.87 ± 3.64	70.59 ± 6.50	53.09 ± 2.90	73.54 ± 7.19
	<i>Lenzites</i> sp.	SA	83.94 ± 21.59	35.61 ± 2.07	SA
	<i>Polyporus</i> sp.	SA	SA	61.22 ± 2.42	81.15 ± 2.60
	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (2)	89.70 ± 11.46	77.03 ± 12.79	SA	85.41 ± 1.80
	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (1)	25.04 ± 1.00	20.42 ± 6.10	3.50 ± 0.18	5.14 ± 0.39
	<i>Trametes</i> sp. (1)	SA	42.21 ± 1.18	72.45 ± 2.75	99.21 ± 1.76
	<i>Trametes</i> sp. (2)	SA	97.50 ± 5.82	53.57 ± 1.74	94.97 ± 3.82
	<i>Trametes</i> sp. (3)	SA	SA	35.39 ± 7.87	83.67 ± 2.40
	<i>Trametes</i> sp. (4)	49.54 ± 2.64	59.21 ± 7.75	9.91 ± 3.51	34.67 ± 0.70
<i>Trichaptum</i> sp.	SA	SA	27.26 ± 1.72	77.67 ± 3.82	
Schizophyllaceae.	<i>Schizophyllum commune.</i>	70.94 ± 4.38	48.76 ± 9.16	56.87 ± 1.80	81.68 ± 4.44
Strophariaceae.	<i>Tricholoma</i> sp.	SA	SA	76.96 ± 5.91	81.95 ± 3.02
Tricholomataceae.	<i>Collybia</i> sp. (1)	SA	SA	75.76 ± 2.72	80.19 ± 45.68
	<i>Collybia</i> sp. (2)	64.40 ± 9.79	39.27 ± 9.75	14.89 ± 1.57	54.67 ± 4.55

% VB. ± E.E. Resultados correspondientes al porcentaje de viabilidad ± el error estándar. SA sin actividad inhibitoria del crecimiento antitumoral.

Como se puede observar en la **Tabla 2** los extractos que presentaron una mayor viabilidad celular al 70% indican su poca acción antitumoral razón por la que son descartados para las siguientes pruebas, solo los valores de viabilidad menores al 70% en todas las líneas probadas son considerados con fuerte acción anticancerígena de los cuales tenemos las especies: *Pycnoporus sanguineus* (1) *Trametes* sp (4) y *Collybia* sp (2), reflejan bajos valores de viabilidad al ser comparados con las demás muestras.

Las muestras menos activas de los extractos fúngicos que presentaron una viabilidad mayor del 70 % fueron: *Clavulina* sp, *Collybia* sp (1), *Fomitopsis* sp, *Pycnoporus sanguineus* (2), *Tricholoma* sp. Existen extractos de especies que únicamente fueron activas en la línea celular D-384 estas fueron: *Auricularia* sp (51.33%), *Auricularia* sp (1) (26.71%), *Coprinus* sp (67.08%), *Hydnellum* sp (61.62%), *Lentinula* sp (55.93%), *Lentinus crinitus* (2) (28.25%), *Lentinus crinitus* (3) (35.62%), *Lentinus crinitus* (4) (53.09%), *Lenzites* sp (35.61%), *Pleurotus djamor* (44.40%), *Polyporus* sp (61.22%), *Trametes* sp (2) (53.57%), *Trametes* sp (3) (35.39%), *Trichaptum* sp (27.26%) de viabilidad celular. Además *Trametes* sp (1) (42.21%) que presento actividad en la línea tumoral RKO. Solamente un extracto de la especie *Schizophyllum commune* presento actividad en dos líneas celulares 48.76% en células RKO y 56.87% en células D-384. En el caso de la especie *Lentinus crinitus* (1) presento una viabilidad menor del 70% en tres líneas celulares 20.81% en células D-384, 52.80% en RKO y 55.95% en la línea ZR, otra especie que demostró actividad en tres líneas tumorales fue *Tetrapyrgos* sp con valores de 40.93% en D-384, 65.82% en RKO y del 66.30% en células MCF-7. Como se puede observar los extractos en general fueron más activos en la línea celular D-384.

En el caso de los extractos de *Pycnoporus sanguineus* (1) mostró una viabilidad menor de todos los descritos en la Tabla 2, 3.50% en la línea celular D-384, pero además mostro actividad en todas las líneas probadas siendo la viabilidad más alta del 25.04% en la línea MCF-7; mientras que el caso de *Pycnoporus sanguineus* (2) presento valores de viabilidad mayores al 70% en todas las líneas probadas motivo por el cual no es analizado en estudios próximos. El extracto de *Trametes* sp (4) presenta mayor acción en la línea celular D-384 con un porcentaje de viabilidad del 9.91% en relación a las otras tres líneas celulares y con las muestras de su misma especie, *Trametes* sp (1) (2) (3) presentan valores mayores al 70% de viabilidad en la mayoría de las líneas probadas

solo *Trametes* sp (1) tiene un valor de 42.21% en células RKO y *Trametes* sp (3) con 35.39% de viabilidad en células D-384 son menores del 70% de viabilidad pero son inconsistentes en las demás líneas, razón por la cual son descartados para posteriores análisis. En el caso del extracto de *Collybia* sp (2), esta es mucho más activa que la homóloga de su misma especie *Collybia* sp (1), los valores de viabilidad del extracto de *Collybia* sp (2) reflejan mayor actividad en células D-384 con valores de 14.89% y con valores de 64.40% en células MCF-7 su valor más alto de viabilidad en relación a los valores de la otra especie que están por encima del 70%, en líneas celulares como MCF-7 y RKO no presenta ninguna actividad. Aunque los extractos pertenecen a una misma especie hay que considerar que fueron recolectados de distintos ecosistemas, así como los estados de fructificación por los cuales, cuantitativamente el metabolismo secundario también sea diferente (Savoie & Largeau, 2011). La mayoría de la madera en los bosques se encuentra caída y esta alberga gran cantidad de raíces micorrizadas (C. V. Toledo, Barroetaveña, & Rajchenberg, 2014) que constituye un reservorio de humedad y nutrientes adicionales en el suelo que favorece la fructificación de especies fúngicas, confiriéndoles características independientes a una especie de otra (Luoma, Eberhart, Molina, & Amaranthus, 2004).

De los extractos con mayor actividad citotóxica en todas las líneas celulares se procedió a determinar la IC₅₀.

4.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos fúngicos a distintas concentraciones.

El ensayo se realizó solamente con los tres extractos fúngicos que presentaron mayor actividad inhibitoria, los cuales fueron de: *Pycnoporus Sanguineus* (1), *Trametes* sp (4), y *Collybia* sp (2), cada uno de los extractos fueron diluidos y aplicados a las concentraciones de: 1, 10, 15, 30, 45, 60,75 y 100 µg/ml.

En la Tabla 3 se muestran el IC₅₀ de los tres extractos a distintas concentraciones sobre las líneas celulares tumorales (MCF-7, RKO, D-384, ZR).

Tabla 3. Valores correspondientes del IC₅₀, en las líneas celulares (MCF-7, RKO, D-384, ZR).

Línea Celular.	MCF-7	RKO	D-384	ZR
	IC ₅₀ ±E.E	IC ₅₀ ±E.E	IC ₅₀ ±E.E	IC ₅₀ ±E.E
<i>Pycnoporus sanguineus</i> (1).	45,62 ± 0,06	17,81 ± 0,06	2,40 ± 0,10	13,42 ± 0,09
<i>Trametes</i> sp (4).	67,82 ± 0,60	48,61 ± 0,08	60,33 ± 0,07	78,01 ± 0,05
<i>Collybia</i> sp, (2).	>100	>100	77,63 ± 0,03	>100

Los valores correspondientes al IC₅₀ son diferentes para cada línea celular, el extracto con valores menores al 30% de inhibición son considerados con alto índice de acción antitumoral siendo el extracto de *Pycnoporus sanguineus* (1) la más activa con un valor de 2.40 en células D-384, en células ZR 13.42 , en células RKO 17.81 y en células MCF-7 de 45.62 siendo este último su valor más alto pero como se observa en la Tabla 3 este extracto es el de mayor actividad con índices de inhibición relativamente altos en todas las líneas tumorales. El extracto de *Trametes* sp (4) tiene mayor inhibición en la línea celular RKO con un valor de 48.61 y es menos activa en las otras tres líneas tumorales con un valor de 78.01 en células ZR que representa su valor más elevado. La especie de *Collybia* sp (2) su extracto presento valores mayores a 100, solo en la línea celular D-384 presenta un valor de 77.63 lo cual lo interpretamos que esta especie no presenta mayor inhibición por lo que sus porcentajes se encuentran sobre el 30% establecido.

Estos valores son la representación de nuestros extractos en la inhibición de las reacciones biológicas o bioquímicas, teniendo en cuenta que el IC₅₀ es la medida o cantidad necesaria que necesita un fármaco, sustancia o extracto inhibidor para una inhibición del 50% *in vitro*. (Darnaud, Prieto, & Sequeira, 2006). Se puede relacionar que los principios activos que comprenden a los hongos son: flavonoides, alcaloides, polisacáridos, esteroides, triterpenos, saponinas, lignanos, entre otros pero se debe tener en cuenta que muchas veces los efectos farmacológicos de los hongos no se deben a uno solo de sus compuestos, sino a la actividad sinérgica de todos los compuestos presentes (García, 2016).

Los hongos han sido clasificados en diferentes familias y clases, una de las familias es la de los basidiomicetos, usados en la medicina popular desde tiempos ancestrales, todos ellos se han caracterizado por la importancia en la búsqueda de compuestos antivirales, antibacterianos, antifúngicos y citotóxicos, producidas como metabolitos secundarios en su crecimiento. (Sanchez & Mata, 2013). Teniendo en consideración que la especie *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes* sp y *Collybia* sp, pertenecen a la división y subclase de los basidiomicetos.

El estado de procedencia de las muestras juega un papel muy importante, así en, los basidiomicetos son un grupo de importancia pues tienen esencial participación en la naturaleza por la versatilidad de sus especies que lo constituyen pero la mayoría de sus especies están relacionadas con la podredumbre de plantas en especial árboles, existe información cuando el hongo ha sido recolectado de árboles en un estado de pudrición avanzado estos hongos pierden parte de la funcionalidad de enzimas que oxidan y

reducen compuestos (Rojas Ramírez, 2013). Los principales tipo de pudrición en la que están presentes los hongos son: Pudrición blanca, pudrición marrón y pudrición blanda estas difieren una de otras dependiendo del estado de la planta en las que actúen y el nivel de putrefacción (J. D. Toledo, 2011). En la pudrición blanca, son los únicos microorganismos que son capaces de degradar eficientemente compuestos aromáticos y heterogéneos al presentar un complejo enzimático inespecífico con actividad oxidativa contra una amplia variedad de sustancias tóxicas y recalcitrantes actuando en suelos y aguas contaminadas, lo que ha deteriorado sus capacidades antifúngica, fitotóxica y nematocida (Rojas Ramírez, 2013). Basados en los patrones de las enzimas lignolíticas, los hongos de pudrición blanca pueden dividirse en dos grupos, el primero como productores de lacasa y manganeso peroxidasa exclusivamente y aquellos que producen lignino peroxidasa, estos grupos están relacionados con la degradación preferentemente de la lignina de la pared celular (Hattaka A., 1994). Por tales motivos en la última década se ha aumentado las investigaciones, con objetivo de potenciar o incrementar la actividad enzimática de estos hongos deslignificadores, debido que pertenecen a este grupo especies con importancia en la medicina por presentar metabolitos con actividad biológica contra una amplia gama de patologías clínicas, incluso influyen positivamente en la profilaxis y tratamiento del sida (Rojas Ramírez, 2013).

La información nos indica que *Collybia* sp, fue catalogado como una especie comestible (L. Robles et al., 2007), algunos de estos presentan compuestos con actividad antibiótica y se los ha agrupado acorde a su naturaleza química, el *Collybia* sp, aislado de una cepa de *Collybia confluens*, presento un sesquiterpenoide que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas, y ha demostrado una potente actividad citotóxica (Brizuela et al., 1998). Esta cepa presenta fracciones solubles e insolubles, las cuales presentan componentes como: hidratos de carbono, proteínas y sustancia pequeñas de minerales, de los cuales los extractos acuosos han demostrado actividad inmunomoduladora estos presentaban efecto estimulante sobre células del sistema inmune específicamente activación de macrófagos (Kozhemyakina, Ananyeva, Gurina, & Galynkin, 2010). Sin embargo estudios han comprobado la administración conjunta de la proteína inmunomoduladora FIP-FVE (human papillomavirus-16 E7) y un antígeno antitumoral mejora la inmunidad asociada al tumor al presentar propiedades adyuvantes potentes que mejoran las respuestas inmunes, humorales y celulares específicas del antígeno que confieren fuertes efectos antitumorales (Ding et al., 2009), así como desencadenar las reacciones para mejorar la producción de interleucinas (IL) -2, IFN-C

y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Bao, Ochiai, & Ohshima, 2010). Razón por la cual nos podemos basar que el extracto fúngico obtenido de *Collya* sp, es una fuente de metabolitos que brindan un sin número de atributos a sus compuestos y llegan a presentar reacciones de activación, oxidación, inmunidad del sistema inmune en la células.

Los estudios previos nos indican que la especie de *Trametes versicolor* por sus capacidades de adaptación pueden vivir en diferentes ecosistemas algunas muestras de estos fueron colectados en la Amazonía de Bolivia y estudiados por su exitosa y alta producción de lacasa, una enzima que contribuye a la degradación de colorantes textiles (Melgarejo, 2015). Se ha demostrado la capacidad de los basidiomicetos *Trametes versicolor* para decolorar efluentes de industrias aceiteras, textiles o papeleras; también para degradar o modificar diferentes sustratos, tales como pulpas papeleras, clorofenoles, por lo que constituyen una herramienta de potencial aplicación en la industria del papel, principalmente en el proceso de deslignificación durante el blanqueo de la pulpa y en la industria textil, como por ejemplo al decolorar colorantes industriales como el violeta cristal, el verde brillante (Tonantzin et al., 2013). Al ser considerados una fuente natural de metabolitos secundarios los hongos son capaces de desencadenar todas las señales de activación del sistema inmune, muchos compuestos aislados de estas cepas de hongos han demostrado que previenen la oncogénesis, al mostrar actividad antitumoral sobre varios tumores singénicos y alogénicos. Previenen, además, la metástasis tumoral, al no atacar directamente a las células del tumor estas especies pertenecen a los géneros: *Auricularia*, *Flammulina*, *Ganoderma*, *Grifola*, *Hericium*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Schizophyllum* (Llauradó Maury, Morris Humberto, Marcos Albear, L, & Bermúdez Rosa, 2011)

El género *Trametes*, presenta propiedades inmunomoduladoras y antitumorales, además de presentarse como una forma alternativa a los efectos colaterales provocados por la quimioterapia y radioterapia (Europa et al., 2012). Existe un gran número de polisacáridos aislados de basidiomicetos, hogliucanos, heterogliucanos, y complejos polisacárido-proteínas que han sido extraídos de cuerpos fructíferos sean estos cultivados in vitro o tomados de su entorno, estos polisacáridos y metabolitos presentan diferencias químicas, estructurales, físicas y en su actividad antitumoral (Daba & O.U.Ezeronye, 2003). Una de las fuentes de polisacáridos antitumorales se los relaciona con la pared celular de los hongos los cuales presentan en su estructura polisacáridos como: celulosa, quitina, (1→3)-β-glucano, (1→6)-β-glucano, (1→3)-α-glucano, los entinanos, los esquizofilanos ya que presentan propiedades antimunogénicas e

inmunomoduladoras (Wasser, 2003), estos compuestos se los ha relacionado en estudios preliminares por sus propiedades para retardar el crecimiento de tumores y como estimuladores del sistema inmune activando macrófagos, mocitos, linfocitos T, células NK, liberando interleucinas (IL) (Europa et al., 2012) si bien este mecanismo o cascadas de activación de los polisacáridos no ha sido descrito completamente se les confiere las propiedades mencionadas (González, 2010). Estudios detallan que dos polisacáridos analizados en China y Japón por sus propiedades terapéuticas frente al cáncer son el PSK (polisacárido-K) y PSP (polisacárido-péptidos) los cuales son aislados del cuerpo fructífero del hongo *Trametes versicolor* (Yaver et al., 1996) de los cuales PSK ha tenido gran éxito en tratamiento de cáncer gastrointestinal, colon y mama, este ha revelado un aumento en el sistema inmune del huésped, además de incrementar la supervivencia en pacientes tratados en combinación con agentes quimioterapéuticos sin manifestar efectos adversos relevantes (Kidd, 2000). La literatura nos reporta que en Japón se comercializa un fármaco con el nombre de Krestin® (PSK) que ha sido evaluado en pacientes operados de cáncer colorectal y para el tratamiento combinado con quimioterapia, radioterapia y cirugía en pacientes con cáncer gastrointestinal, cérvico-uterino, de mamas y pulmonar (Miyazaki, Yadomae, Sugiura, Ito, & Fujii, 1974). Se ha demostrado que PSK provoca un aumento en la inducción de caspasa-3 y la supresión de NF-kB al ser administrada en conjunto con el agente quimioterapéutico docetaxel (Kofschoten, Hulscher, Duyndam, Pinedo, & Boven, 2002). Por esta razón se considera a los compuestos de esta especie como moduladores en la activación inmune y presentarse como una alternativa de terapia específica sobre el cáncer al no ser invasiva.

Los resultados obtenidos denotan que *Pycnoporus sanguíneus* (1) posee un porcentaje de viabilidad relativamente bajo al compararlo con los de más extractos en todas las líneas celulares probadas, sus valores de viabilidad son sustancialmente menores en relación a los extractos de las demás especies teniendo 25.04% de viabilidad para la línea celular MCF-7, del 20.42% para células RKO, del 5.14% para células ZR y del 3.50% para células D-384 siendo este valor el más bajos de todos los extractos probados y que nos representan la mayor actividad antitumoral. La IC₅₀ de este compuesto es la menor de todas las muestras su valor de 2,40 en líneas celulares D-384 la más baja y de 45,62 la más alta en la línea MCF-7, por lo tanto nuestros valores se encuentran dentro del rango de viabilidad e inhibición por lo que se determina que el extracto de esta especie es la más activa.

Al igual que los demás de su misma especie *Pycnoporus sanguineus*, tiene una importancia dentro de la industria textil, industria papelera, elaboración de bebidas y produce metabolitos con potencial farmacéutico, presenta propiedades contra toxinas, reumatismo e infecciones fúngicas (Obscura, Puebla, & Acosta, 2016). Se tiene conocimiento que la parte de los hongos de mayor importancia científica es la pared celular porque es rica en compuestos como: glucoproteínas, quitina, glucanos. Algunos hongos poseen en sus membranas compuestos que tienen componentes de alta capacidad inmunogénica. (Pontón, 2008). En la industria es utilizado en la producción de tintes, en la medicina tiene importancia para la cura de enfermedades de la piel, enfermedades venéreas y la disentería (Cabarroí, Maldonado, & Castillo, 2008).

Estudios previos han demostrado que *Pycnoporus sanguineus* es capaz de secretar enzimas extracelulares: entre ellas invertasas, tirosinasas, α -amilasas, β -glucosidasas, xilanasas, lignina peroxidasa, Mn peroxidasa, lacasas y exo-poly- galacturonasa (Neto, Matheus, & Machado, 2009). *Pycnoporus sanguineus* ha sido estudiado por los metabolitos que produce tales como reguladores de crecimiento, compuestos aromáticos, pigmentos y enzimas (Villegas, 2016), posee actividad antimicrobiana que se atribuye a la cinabarina actuando sobre cepas de bacterias Gram-positivas antes que bacterias Gram-negativas (Quiroga et al., 2009). Esta especie presenta una importancia biotecnológica debido a su poder lignocelulítico, se conoce de cuatro compuestos producidos por *Pycnoporus sanguineus* poliporin, cinnabarina, ácido cinabarínico y tramesanguina (Cruz Muñoz et al., 2015).

El poliporin afecta bacterias Gram positivas y Gram negativas, sin efectos tóxicos en animales de experimentación (Rosa et al., 2003). La cinnabarina es un pigmento naranja, tiene actividad antibiótica contra *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *S. typhi*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp., así como una mayor actividad antibiótica contra bacterias Gram positivas que negativas (Smânia et al. 1995, 1997) Se ha reportado que activa la circulación sanguínea y que tiene actividad antitumoral (Sanches & Mata, 2013).

Según los resultados obtenidos se puede apreciar que las tres especies de interés *Pycnoporus sanguineus* (1), *Trametes* sp (4) y *Collybia* sp (2), tienen diferentes efectos, sus valores se ven reflejados en los porcentajes de viabilidad celular o de inhibición tumoral, todo esto se lo puede relacionar a que cada especie presenta diferentes mecanismos o metabolitos que interactúan de manera distinta con la membrana celular

de nuestras líneas tumorales sea degradándolas o desintegrándolas lo cual le confiere la mayoría de las propiedades antes mencionadas.

CONCLUSIONES

- La actividad citotóxica de los extractos fúngicos, fue considerada si los valores eran mayores al 30% de inhibición las muestras, de los cuales *Pycnoporus sanguineus* (1), *Trametes* sp (4), y *Collybia* sp (2) son los que fueron más activas en las líneas celulares estudiadas.
- El extracto de *Pycnoporus sanguineus* (1), es el que presento mayor efecto inhibidor en todas las líneas celulares, siendo más activo en la línea celular D-384 con una IC₅₀ de 2,40.
- *Trametes* Sp (4) tiene efecto inhibidor en la línea tumoral RKO con un porcentaje de (46,61) y el extracto de *Collybia* Sp (2) tiene efecto inhibidor en células D-384 con un porcentaje de 77,63 si bien presentan un mínimo porcentaje de acción antitumoral sus valores sobrepasan el 30% en todas las líneas tumorales probadas motivo por el cual no presentan efecto inhibidor de crecimiento significativo.

BIBLIOGRAFÍA.

- ABTA. (2002). Sobre tumores cerebrales. Manual para pacientes y cuidadores. In *American Brain Tumor Association*.
- Aguilar Ticona, M., & Gho Daniel, A. (2009). Cáncer de mama. *Revista Salud, Sexualidad Y Sociedad*, 1(4), 4–5.
- Alexopoulos, C. J., Mins, C. W., & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. (I. John Wiley & Sons, Ed.) (4 ht. ed). USA.
- Al-Fatimi, M. A. A., Jülich, W. D., Jansen, R., & Lindequist, U. (2006). Bioactive components of the traditionally used mushroom *Podaxis pistillaris*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(1), 87–92. <http://doi.org/10.1093/ecam/nek008>
- American Cancer Society. (2015). *Cancer Facts & Figures 2015*. *Cancer Facts & Figures 2015*. <http://doi.org/10.1097/01.NNR.0000289503.22414.79>
- Azpeitia, N., Leyva, R., López, B., Luna, M., Nava, B., & Tovar, E. (2013). Determinacion de la velocidad de crecimiento de *Trametes* sp. a diferentes condiciones: pH (ácido, del medio y básico), temperatura, y medio de cultivo. *Ingeniería En Biotecnología*.
- Bao, H. N. D., Ochiai, Y., & Ohshima, T. (2010). Antioxidative activities of hydrophilic extracts prepared from the fruiting body and spent culture medium of *Flammulina velutipes*. *Bioresource Technology*, 101(15), 6248–6255. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.026>
- Becerra, M., & Robles, E. (2012). *Guía de iniciación a la Micología en el Parque Natural los Alcornocales*. (L. Serranía, Ed.).
- Belloso, K., González, I., Suárez, R., & Cáceres, A. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diez basidiomicetos comestibles en Guatemala, 2, 119–126.
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2),

474–482. <http://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>

- Bingham, S., Day, N., Luben, R., Ferrari, P., Slimani, N., Norat, T., ... Riboli, E. (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *The Lancet*, *361*, 1496–1501. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13174-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13174-1)
- Brizuela, M., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol*, 69–74. Retrieved from <http://sites.google.com/site/microbiologytec/hongos/BASIDIOMICETOS.pdf>
- Cabarroi, M., Maldonado, S., & Castillo, L. (2008). Hongos del Jardín Botánico Nacional de Cuba . I . Basidiomycota. *Jardín Botánico Nacional*, *29*, 161–169.
- Calderón, Á. I., Vázquez, Y., Solís, P. N., Caballero-George, C., Zacchino, S., Gimenez, A., ... Gupta, M. P. (2006). Screening of Latin American Plants for Cytotoxic Activity. *Pharmaceutical Biology*, *44*(2), 130–140. <http://doi.org/10.1080/13880200600592285>
- Capdeville, F., Salas, C., Kleiman, S., & Cadiz, F. (2015). Evolución histórica del cáncer. *Innovacion Oncologica En Clinica Alemana*, 14–17.
- Chabner, B. A., & Longo, D. L. (2001). *Cancer chemotherapy and biotherapy: principales and practice*. (L.-W. & Wilkins, Ed.) (3a. Ed.). Philadelphia.
- Cortez, V. G., Baseia, I. G., & Mara, B. (2008). ARTIGO Gasteromicetos (Basidiomycota) no Parque Estadual de Itapuã , Viamão , Rio Grande do Sul , Brasil. *Ecologia*, *4849*, 291–299.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2009). Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry Reviews*, *8*(2), 313–331. <http://doi.org/10.1007/s11101-009-9123-y>
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1830*(6), 3670–95. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Crespi, B., & Summers, K. (2005). Evolutionary biology of cancer. *Trends in Ecology & Evolution*, *20*(10), 545–552. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2005.07.007>

- Cruz Muñoz, R., Piña-Guzmán, A. B., Yáñez-Fernández, J., Valencia-Del Toro, G., Bautista-Baños, S., & Villanueva Arce, R. (2015). Producción de pigmentos de *Pycnoporus sanguineus* en medio de cultivo sólido. *Agrociencia*, 49(4), 347–359.
- Daba, a S., & O.U.Ezeronye. (2003). Anticancer effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms. *African Journal of Biotechnology*, 2(December), 672–678.
- Darnaud, R., Prieto, V., & Sequeira, M. D. (2006). Análisis de la actividad citotóxica de la WP631 en las líneas celulares Jurkat T, MCF-7/VP y MDA-MB-231., 119–124.
- Ding, Y., Seow, S. V., Huang, C. H., Liew, L. M., Lim, Y. C., Kuo, I. C., & Chua, K. Y. (2009). Co-administration of the fungal immunomodulatory protein FIP-Fve and a tumour-associated antigen enhanced antitumour immunity. *Immunology*, 128(1 PART 2), 881–894. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03099.x>
- Europa, E. C., Valdivia, V. B., Sánchez, R. R., Manzo, P. T., Colín, M. F., García, A. H., & Butrón, R. O. (2012). microalgas , algas y hongos Therapeutic use of some microorganisms , microalgae , algae , and fungi, 43(4).
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... Bray, F. (2013). GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. <http://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.01.011>
- Fortún, J., Carratalá, J., Gavaldá, J., Lizasoain, M., Salavert, M., de la Cámara, R., ... Cuenca-Estrella, M. (2011). Recomendaciones sobre el tratamiento de la enfermedad fúngica invasiva por *Aspergillus* spp. y otros hongos filamentosos de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 29(6), 435–454. JOUR. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2011.01.010>
- Freshney, R. I. (2011). *Culture of Animals Cells, A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. (6th editio).
- García, S. (2016). Metabolitos secundarios con actividad antifúngica hacia hongos xilófagos, (February).
- Garrido, H., & Yunga, E. (2010). Incidencia del Cáncer en Loja. Estudio de una década. SOLCA núcleo de Loja. *Imprenta UTPL*.

- Geetha, B. S., Nair, M. S., Latha, P. G., & Remani, P. (2012). Sesquiterpene lactones isolated from *Elephantopus scaber* L. Inhibits human lymphocyte proliferation and the growth of tumour cell lines and induces apoptosis in vitro. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/721285>
- Gobernado, M., & Cantón, E. (2008). [Anidulafungin]. *Revista Española de Quimioterapia: Publicación Oficial de La Sociedad Española de Quimioterapia*, 21(2), 99–114. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18509769>
- Golias, C. H., Charalabopoulos, a., & Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control : a mini review. *International Journal of Clinical Practice*, 58(12), 1134–1141. <http://doi.org/10.1111/j.1368-5031.2004.00284.x>
- Gomes, R. N., & Colquhoun, A. (2012). E series prostaglandins alter the proliferative, apoptotic and migratory properties of T98G human glioma cells in vitro. *Lipids in Health and Disease*, 11(1), 1–11. <http://doi.org/10.1186/1476-511X-11-171>
- González, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos, 87. <http://doi.org/http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>
- Gonzalez, C. (2004). Instituto Nacional del Cáncer. *Manual de Enfermería Oncológica*, 23–9. Retrieved from www.msal.gov.ar/inc
- González, C. (2010). Evaluación in vitro del efecto apoptótico de polisacáridos y complejos polisacárido-proteína sobre células tumorales N2A y células no tumorales MDCK, presentes en extractos miceliales de *Agrocybe aegerita* y *Hericium erinaceum*., 102.
- Guzman, G. (2004). Los hongos de El Edén Quintana Roo. Introducción a la microbiota tropical de México., 46.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–74. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hattaka A. (1994). Lignin-modifying Enzymes from Selected White-Rot Fungi: Production and Role in Lignin Degradation., rev 13, 125–135.
- Herrera, T., & Ulloa, M. (1990). El Reino de los Hongos, micología básica y aplicada. *UNAM-Fondo de Cultura Económica, México*, 552.

- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., & Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69–90. <http://doi.org/10.3322/caac.20107>
- Jiménez Medina, E. M. (2006). Estudio de las actividades antitumorales de un extracto de caléncula: propiedades inmunomoduladoras y citotóxicas, 184.
- Kendig, D. M., & Tarloff, J. B. (2007). Inactivation of lactate dehydrogenase by several chemicals: Implications for in vitro toxicology studies. *Toxicology in Vitro*, 21(1), 125–132. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.08.004>
- Kidd, P. M. (2000). The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. *Alternative Medicine Review*, 5(1), 4–27.
- Kiss, K., & Bräuning, A. (2008). El bosque húmedo de montaña, 1–64. Retrieved from http://www.naturalezaycultura.org/docs/bosque_humedo
- Kolfschoten, G. M., Hulscher, T. M., Duyndam, M. C. A., Pinedo, H. M., & Boven, E. (2002). Variation in the kinetics of caspase-3 activation, Bcl-2 phosphorylation and apoptotic morphology in unselected human ovarian cancer cell lines as a response to docetaxel. *Biochemical Pharmacology*, 63(4), 733–743. [http://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00895-4](http://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00895-4)
- Kozhemyakina, N. V., Ananyeva, E. P., Gurina, S. V., & Galynkin, V. A. (2010). Conditions of cultivation, composition, and biological activity of mycelium of *Flammulina velutipes* (Fr.) P. Karst. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(5), 536–539. <http://doi.org/10.1134/S0003683810050121>
- Kvist, L. P., Aguirre, Z., & Sánchez, O. (2006). Bosques montanos bajos occidentales en Ecuador y sus plantas útiles. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 205–223.
- Ladio, A. H. (2005). Malezas exóticas comestibles y medicinales utilizadas en poblaciones del NO patagónico: aspectos etnobotánicos y ecológicos. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 4, 75–80.
- Llauradó Maury, Morris Humberto, D. ., Marcos Albear, J., L, C., & Bermúdez Rosa, D. (2011). Plantas y hongos comestibles en la modulación del sistema inmune. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 30(4), 511–527.

- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Monty, K., Scott, M. P., ... Darnell, J. (2009). *Biología Celular y molecular*. (E. M. P. S.A, Ed.) (5 th Edici). Buenos Aires.
- Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, J. C., & Lesage-Meessen, L. (2011). Peculiarities of Pycnoporus species for applications in biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *92*(6), 1129–1149. <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3596-5>
- Lozano Ascencio, R., Gómez Dantés, H., Lewis, S., Torres Sánchez, L., & López Carrillo, L. (2009). Tendencias del cáncer de mama en América Latina y el Caribe. *Salud Pública de México*, *51*(3), s147–s156. <http://doi.org/10.1590/S0036-36342009000800004>
- Luoma, D. L., Eberhart, J. L., Molina, R., & Amaranthus, M. P. (2004). Response of ectomycorrhizal fungus sporocarp production to varying levels and patterns of green-tree retention. *Forest Ecology and Management*, *202*(1–3), 337–354. <http://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.07.041>
- Marcatoma, E. (2014). Comparación de Hongos Ectomicorrícicos Asociados a Especies de Bosque Altoandino y Plantaciones de pinus Patula, en el area de Influencia del Parque Nacional Cajas, *1*(1), 82.
- Melgarejo, E. (2015). Algunos usos de los hongos silvestres de bolivia en el contexto sudamericano. *Kempffiana*, *11*(1), 48–65.
- Miyazaki, T., Yadomae, T., Sugiura, M., Ito, H., & Fujii, K. (1974). Chemical structure of antitumor polysaccharide, coriolan, produced by *Coriolus versicolor*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *22*(8), 1739–1742. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4430020>
- Morales, M., Vílchez Alvarado, B., Ortega Gutiérrez, M., Ortiz Malavassi, E., Guevara Bonilla, M., Chazdon, R. I., & Ortiz-malavassi, E. (2012). Diversidad y estructura horizontal en los bosques tropicales del Corredor Biológico de Osa, Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, *9*(23), 19–28.
- Neto, S. L. M., Matheus, D. R., & Machado, K. M. G. (2009). Influence of pH on the growth, laccase activity and RBBR decolorization by tropical basidiomycetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *52*(5), 1075–1082. <http://doi.org/10.1590/S1516-89132009000500003>

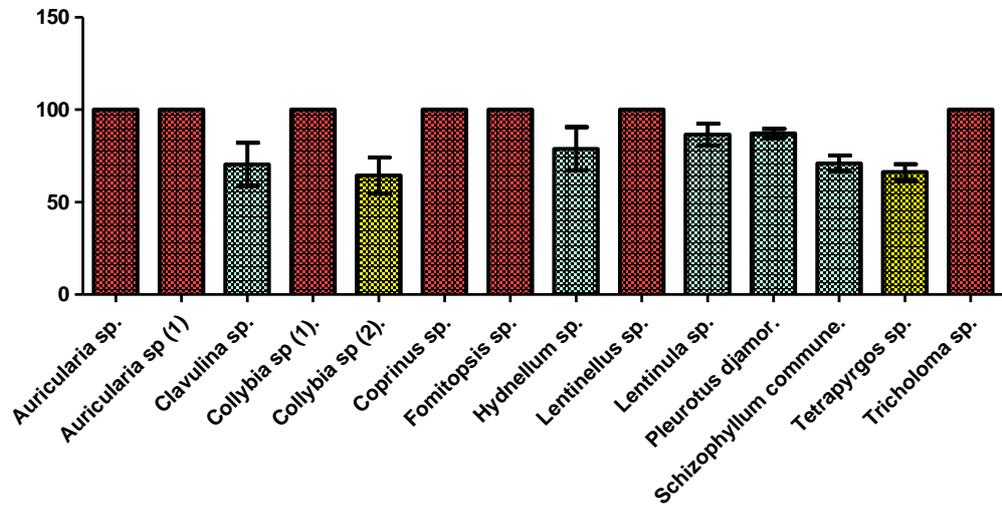
- O'Dell, T. E., Ammirati, J. F., & Schreiner, E. G. (1999). Species richness and abundance of ectomycorrhizal basidiomycete sporocarps on a moisture gradient in the *Tsuga heterophylla* zone. *Canadian Journal of Botany*, 77, 1699–1711. <http://doi.org/10.1139/cjb-77-12-1699>
- Obscura, N., Puebla, C., & Acosta, L. (2016). Uso del Hongo *Pycnoporus sanguineus* Para La Elaboracion de Bebidas. *Investigación Y Desarrollo Den Ciencia Y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 675–679.
- Ofosu Asiedu, A. (2008). El intercambio de experiencias y situacion del conocimiento sobre la ordenacion forestal sostenible de los bosques tropicales húmidos. *Instituto de Pesquisas Espaciais-INPE*, 247–270.
- Papinutti, L. (2013). *Pycnoporus sanguineus*. *Revista Boletín Biológica*, 29(7), 32–33.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 78–82. [http://doi.org/10.1016/S1130-1406\(08\)70024-X](http://doi.org/10.1016/S1130-1406(08)70024-X)
- Promega, C. (2012). *Solution Cell Proliferation CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*. USA. Retrieved from www.promega.com/protocols/
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, a. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria : Organo Oficial de La Sociedad Española de Nutrición Parenteral Y Enteral*, 27(1), 76–89. <http://doi.org/10.3305/nh.2012.27.1.5418>
- Quiroga, E. N., Sgariglia, M. A., Molina, C. F., Sampietro, D. A., Soberón, J. R., & Vattuone, M. A. (2009). Purification and characterization of an exopolygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*. *Mycological Research*, 113(12), 1404–1410. <http://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.007>
- Ramírez, J., Zapata, C. M., León, J. D., & González, M. I. (2007). Caída de hojarasca y retorno de nutrientes en bosques montanos andinos de Piedras Blancas, Antioquia, Colombia. *Interciencia*, 32(5), 303–311.
- Rendón Hernández, G. A. (2015). Caracterización y cultivo de diferentes recursos genéticos de hongos y su importancia en el desarrollo regional de la zona central de México.

- Rivero Martínez, R., Rodríguez Leyes, E. A., Menéndez Castillo, R., Fernández Romero, J. A., Del Barrio Alonso, G., & González Sanabia, T. M. L. (2002). Obtención y caracterización preliminar de un extracto de aloe vera I. con actividad antiviral. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7(1), 32–38.
- Robles, J. (2000). Aislamiento de principios biológicamente activos presente en especies colombianas de la familia Burseraceae, 695.
- Robles, L., Huerta, G., Andrade, R., & Ángeles, H. (2007). Conocimiento tradicional sobre los macromicetos en dos comunidades tzeltales de Oxchuc, Chiapas, México. *Etnobiología*, 5(2005), 21–35.
- Rojas Ramírez, L. (2013). Reseña Los basidiomicetos: una herramienta biotecnológica promisoriosa con impacto en la agricultura. *Fitosanidad*, 17(1), 49–55.
- Sanches, J., & Mata, G. (2013). Investigación Y Desarrollo En Un Entorno Multicultural. *ResearchGate*, (September), 339–347.
- Santisteban, S. (2006). Tema de Revisión Cáncer en el Siglo XXI Cancer in XXIst century. *Lancet, The*, 20(2).
- Sarica, F. B., Cekinmez, M., Tufan, K., Sen, O., Onal, H. C., Mertsoylu, H., ... Altinors, M. N. (2012). Five-year follow-up results for patients diagnosed with anaplastic astrocytoma and effectiveness of concomitant therapy with temozolomide for recurrent anaplastic astrocytoma. *Asian Journal of Neurosurgery*, 7(4), 181–90. <http://doi.org/10.4103/1793-5482.106650>
- Savoie, J. M., & Largeteau, M. L. (2011). Production of edible mushrooms in forests: Trends in development of a mycosilviculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89(4), 971–979. <http://doi.org/10.1007/s00253-010-3022-4>
- Schwabe, L., Nader, K., & Pruessner, J. C. (2014). Reconsolidation of human memory: Brain mechanisms and clinical relevance. *Biological Psychiatry*, 76(4), 274–280. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.008>
- Soriano, J., Galán, Y., Luaces, P., García, A., Arrebola, J., & Carrillo, G. (1998). Incidencia en cuba del cancer en tercera edad, 14(2), 121–128.

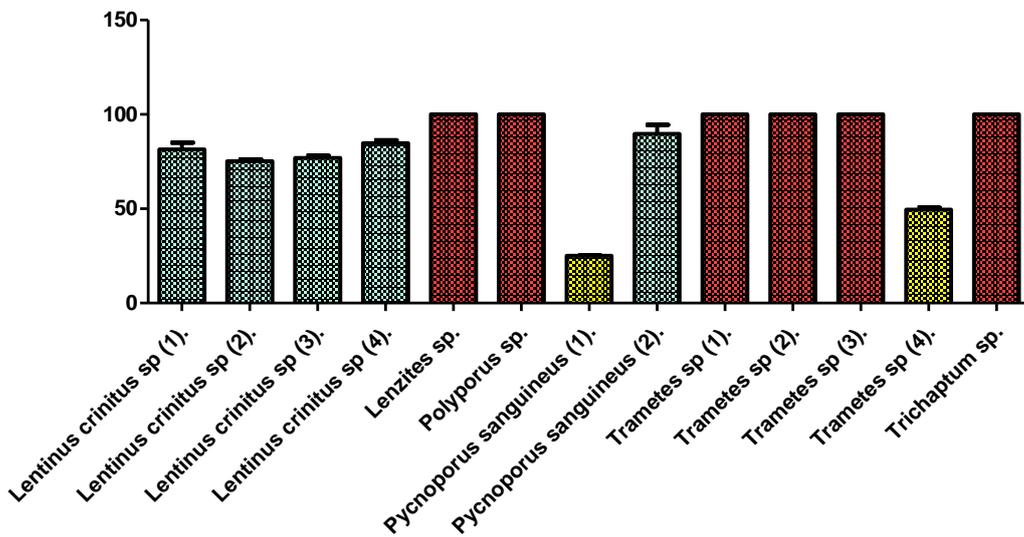
- The American Cancer Society. (2014). Recomendaciones de la Sociedad Americana Contra El Cáncer para la detección temprana del cáncer colorrectal.
- Toledo, C. V., Barroetaveña, C., & Rajchenberg, M. (2014). Fenología y variables ambientales asociadas a la fructificación de hongos silvestres comestibles de los bosques andino-patagónicos en Argentina. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(4), 1093–1103. <http://doi.org/10.7550/rmb.40010>
- Toledo, J. D. (2011). Inventario de Macrohongos. *SalvaNATURA–Fundación Ecológica*.
- Tonantzin, R., Heinz, Q., Manuel, R., Farfán, T., Sánchez, J. M., Ibis, A., ... Delgado, J. (2013). Basidiomicetes: a Promising Biotechnological Harmful with Impact in Agriculture.
- Villegas, E. C. (2016). *Pycnoporus sanguineus un hongo con potencial*.
- Wasser, S. (2003). Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60(3), 258–274. <http://doi.org/10.1007/s00253-002-1076-7>
- Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Brown, S. H., Rey, M. W., ... Dalbøge, H. (1996). Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(3), 834–841.

ANEXOS

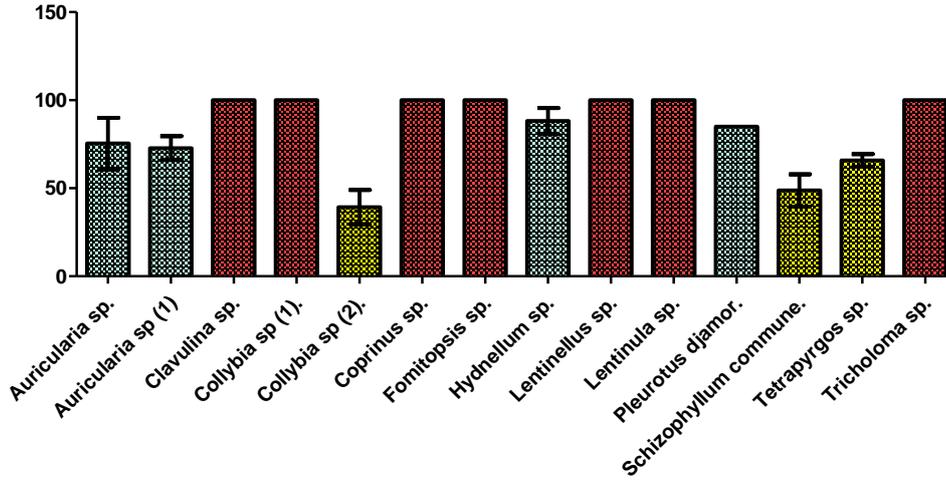
Porcentajes de viabilidad celulas MCF-7



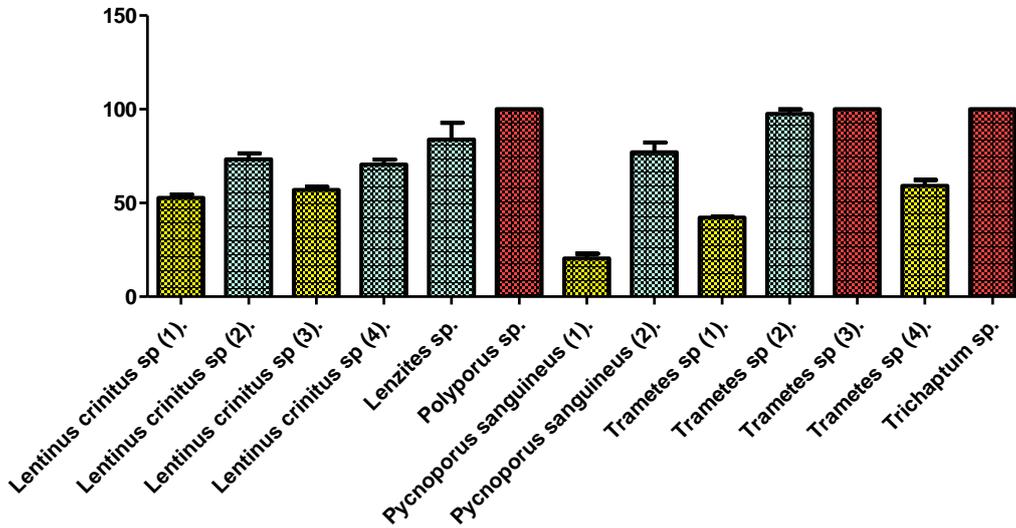
Porcentajes de viabilidad celulas MCF-7



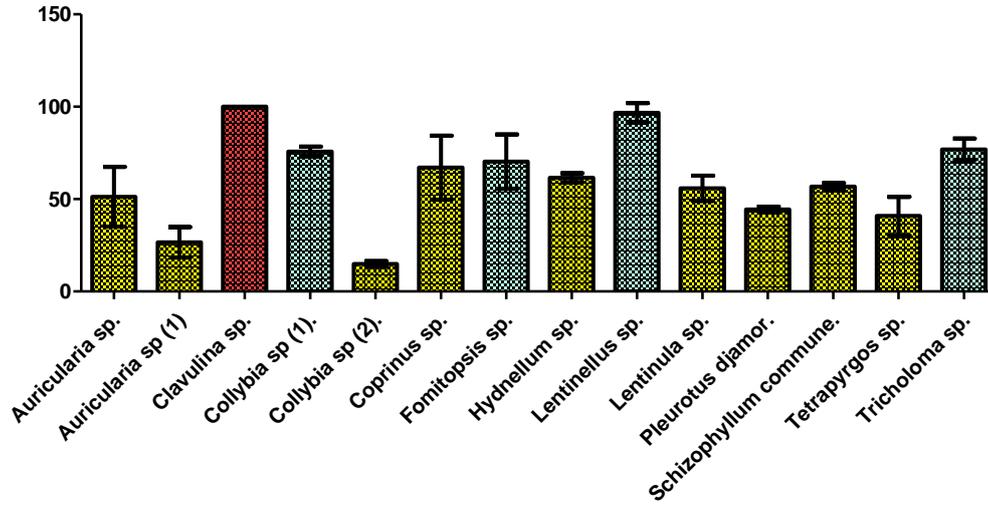
Porcentajes de viabilidad celulas RKO



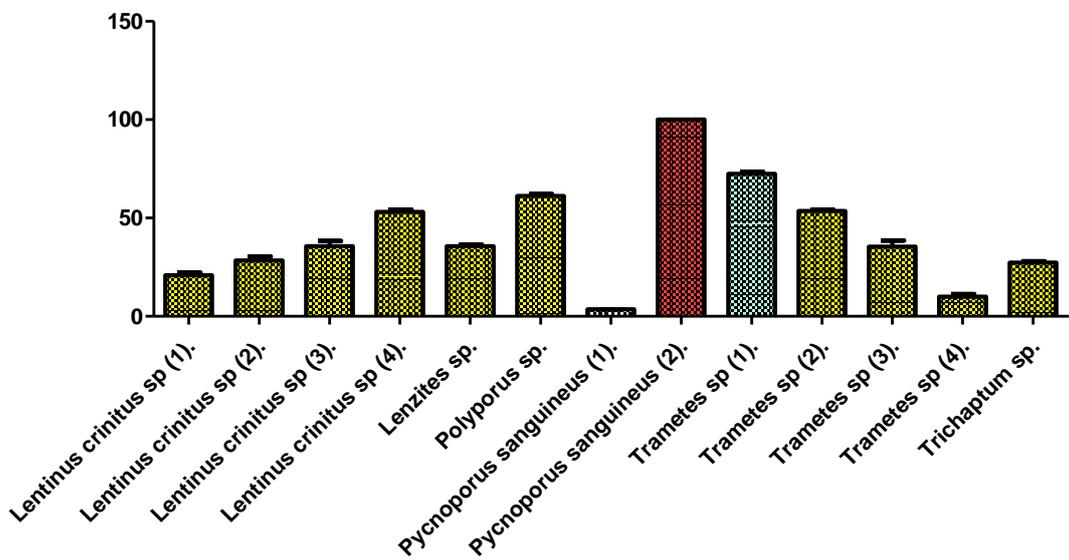
Porcentajes de viabilidad celulas RKO



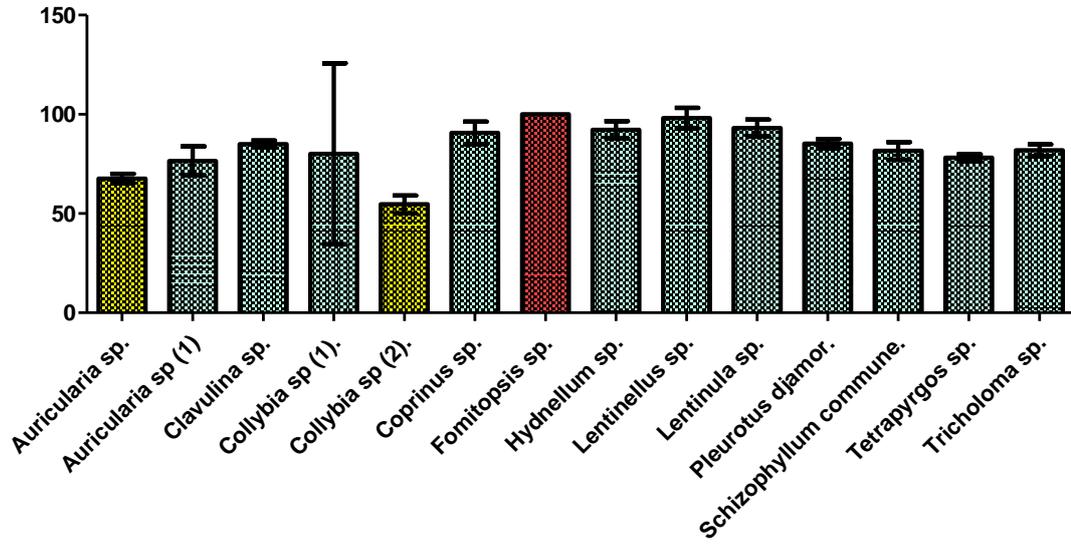
Porcentajes de viabilidad celulas D-384



Porcentajes de viabilidad celulas D-384



Porcentajes de viabilidad celulas ZR



Porcentajes de viabilidad celulas ZR

