



# UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

## ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Actividad citotóxica y mecanismos de muerte celular de distintas  
horchatas expendidas en los principales mercados de la ciudad de  
Loja**

TRABAJO DE TITULACIÓN.

**AUTOR:** Jaramillo Vélez Andrea Gabriela

**DIRECTORA:** Bailón Moscoso Natalia Catalina, PhD.

LOJA-ECUADOR

2017



*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>*

*Septiembre, 2017*

## **APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Doctora.

Natalia Catalina Bailón Moscoso

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

Que el presente trabajo de titulación: “Actividad citotóxica y mecanismos de muerte celular de distintas horchatas expandidas en los principales mercados de la ciudad de Loja”, realizado por Jaramillo Vélez Andrea Gabriela, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Abril de 2017.

f) .....

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Andrea Gabriela Jaramillo Vélez declaro ser autora del presente trabajo de titulación: “Actividad citotóxica y mecanismos de muerte celular de distintas horchatas expandidas en los principales mercados de la ciudad de Loja”, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Natalia Catalina Bailón Moscoso PhD. 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 que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

f).....

Autor: Jaramillo Vélez Andrea Gabriela

CI: 1105859274

## DEDICATORIA

*A Dios, que me ha dado la vida y todo lo que tengo.*

*A mi abuelito que ya no está conmigo, por sus consejos, y sus enseñanzas que me ayudaron a ver lo valiosa que es la vida.*

*A mi padre y madre, que me han demostrado con su ejemplo que la unidad hace la fuerza.*

*A mi hermano y hermanas, que siempre han estado ahí para alegrarme los días.*

*A Pablo, que me ha acompañado durante toda esta etapa de mi vida siempre alegre y dispuesto a ayudarme.*

*A mi familia y amigos, los cuales completan mi vida y me dan razones para vivirla.*

## AGRADECIMIENTO

*A Dios, que ha sido el promotor de mi existencia.*

*A mis padres, gracias por hacer de mí una mujer luchadora, valiente, feliz y por enseñarme a jamás rendirme ante los problemas sino ver en ellos una oportunidad para salir adelante, por su amor incondicional.*

*A mi tutora, Dra. Natalia Bailón Moscoso por su exigencia y sus conocimientos día a día que me han ayudado a culminar este proyecto.*

*A Mgtr. María Isabel Ramírez y el Dr. Luis Guamán por compartirme sus conocimientos.*

*A quienes forman parte del Laboratorio de Genética Toxicológica.*

*A Gaby y Sandra por enseñarme lo esencial.*

*A Viviana, Alejandra y Luisa por su amistad y apoyo.*

*A todos mis profesores de la titulación.*

*A mis amig@s y compañer@s.*

*A todos gracias por hacerme de mí alguien diferente*

*Andrea Gabriela Jaramillo Vélez*

## INDICE DE CONTENIDOS

<b>APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....</b>	<b>ii</b>
<b>DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>v</b>
<b>INDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE GRÁFICAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>5</b>
1.1    Cáncer.....	6
1.1.1    Causas.....	6
1.1.2    Incidencia del cáncer.....	6
1.2    Cáncer de cerebro.....	7
1.2.1    Astrocitoma.....	7
1.3    Tratamiento para astrocitoma cerebral grado IV o “GBM”.....	8
1.3.1    Cirugía.....	8
1.3.2    Radioterapia.....	9
1.3.3    Quimioterapia.....	9
1.4    Metabolitos secundarios de plantas.....	9
1.5    Medicina tradicional.....	10
1.6    Horchata.....	10
1.7    Tipos de muerte celular.....	11
1.7.1    Apoptosis.....	12
1.8    Regulación de rutas implicadas en el proceso de muerte celular.....	16
1.8.1    Daño genotóxico.....	16
1.8.2    Familia de p53.....	17
1.9    Ensayo de citotoxicidad.....	18
1.9.1    Citotoxicidad.....	18
1.9.2    Ensayo de proliferación celular (MTS).....	18
1.10    Biomarcadores.....	18
1.10.1    Biomarcadores apoptóticos.....	19
1.10.2    Evaluación de la distribución de la fosfatidilserina.....	19

1.10.3	Detección de proteínas: técnica de western blot. ....	20
<b>CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....</b>		<b>21</b>
2.1	Objetivo general del proyecto. ....	22
2.2	Objetivos específicos del proyecto. ....	22
<b>CAPITULO III. MÉTODOS.....</b>		<b>23</b>
3.1	Obtención y preparación de liofilizados de horchata. ....	24
3.2	Cultivo celular. ....	24
3.3	Aislamiento de linfocitos.....	25
3.4	Siembra celular. ....	25
3.5	Ensayo de proliferación celular (MTS).....	26
3.6	Determinación de concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ).....	26
3.7	Determinación del tipo de muerte celular (Evaluación de la distribución de fosfatidilserina). ....	26
3.8	Extracción y cuantificación de proteínas. ....	27
3.9	Detección de proteínas por Western blot. ....	27
3.10	Análisis estadístico.....	28
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>		<b>29</b>
4.1	Ensayo de proliferación celular (MTS).....	30
4.2	Determinación de concentración inhibitoria 50 (IC <sub>50</sub> ).....	31
4.3	Determinación del tipo de muerte celular (Evaluación de la distribución de fosfatidilserina). ....	31
4.4	Detección de proteínas mediante Western blot.....	33
<b>DISCUSIÓN.....</b>		<b>37</b>
<b>CONCLUSION.....</b>		<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>57</b>
	ANEXO 1. Porcentajes de cada especie que compone a las distintas horchatas expandidas en los principales mercados de Loja.....	58
	ANEXO 2. Esquemas de metodología utilizada para realizar el proyecto. ....	64
	ANEXO 3. Tabla de descripción de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western Blot.....	67



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vía extrínseca de la apoptosis. ....	14
<b>Figura 2 .</b> Vía intrínseca de la apoptosis. ....	14
<b>Figura 3.</b> Fosforilación de H2AX frente a un daño genotóxico. ....	146
<b>Figura 4</b> Regulación de la familia de p-53.....	147
<b>Figura 5.</b> Células de astrocitoma cerebral (D-384) .....	25
<b>Figura 6.</b> Célula D-384 en apoptosis. ....	31

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Porcentaje de muerte.....	32
<b>Gráfica 2.</b> Proteínas apoptóticas.. ..	34
<b>Gráfica 3.</b> Proteínas de la familia de p53 y p21.. ..	35
<b>Gráfica 4.</b> Proteínas nucleares.. ..	36

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efecto citotóxico de las Horchatas en células de cáncer humano, CHO K-1 y sobre la proliferación de linfocitos humanos normales. ....	30
<b>Tabla 2.</b> IC <sub>50</sub> de las Horchatas en células D384.....	31
<b>Tabla 3.</b> Especies presentes en las horchatas efectivas ( <b>H1, H7 y H9</b> ), su concentración en porcentaje (%) y efectos reportados en modelos biológicos .....	38
<b>Tabla 4.</b> Compuestos que se encuentra en las especies presentes en las <b>H1, H7 y H9</b> que producen efectos apoptótico y genotóxico .....	40

## ABREVIATURAS

- A-549:** carcinoma de pulmón
- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- Apaf-1:** apoptotic protease activating factor 1
- ATG:** familia de proteínas activadoras de autofagia
- ATM:** Ataxia Telangiectasia Mutated
- ATP:** adenosine trifosfato
- Bax:** Proteína Bcl-2 asociada a X
- Bcl-2:** linfoma 2 de las células B
- Bcl-xL:** linfoma extra largo de células B
- CADs:** ADNasas caspasa-activado
- CDK:** quinasas dependientes de ciclina
- CHO:** células inmortalizadas de ovario de hámster chino
- CIP:** CDK inhibidor de proteínas
- D-384:** astrocitoma cerebral
- DFF:** factor fragmentación del ADN
- DIABLO:** direct IAP binding protein with low pI
- DISC:** complejo de señalización inductor de muerte
- DMSO:** dimetilsulfoxido
- Ensayo MTS:** Ensayo de proliferación celular
- ER:** retículo endoplasmático
- FADD:** fas dominio de activación de muerte
- Fas R:** fas receptor
- FasL:** fas ligando
- FLIP:** inhibidor celular proteico de FLICE
- FS:** fosfatidilserina
- GBM:** glioblastoma múltiple
- H2AX:** familia de histonas H2A, miembro X.
- HRP:** enzima peroxidasa
- IAPs:** inhibidor de proteínas de apoptosis
- IC<sub>50</sub>:** concentración inhibitoria 50
- IP:** yoduro de propidio

**L-ADNasa II:** ácido, DNasa independiente de cationes II

**LDH:** enzima lactato deshidrogenasa

**MCF-7:** adenocarcinoma mamario

**MDM2:** Mouse double minute 2 homolog

**MLKL:** dominio linaje mixto

**mTOR:** complejo receptor de la rampamicina de los mamíferos

**MTS:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3 carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)- 2H-tetrazolium

**NF-κB:** factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

**Nec-1:** necrostatina

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**p53:** proteína p53 (supresor de tumor)

**p73:** proteína p73 (supresor de tumor)

**PBS:** buffer fosfato salino

**PC-3:** adenocarcinoma prostático grado IV

**PHA:** fitohematoglutinina

**PVDF:** Fluoruro de polivinilideno

**PSA:** persulfato de amonio

**RIPK1:** receptores de interacción quinasa 1

**RIPK3:** receptores de interacción quinasa 3

**RKO:** carcinoma de colon humano

**RPMI:** roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)

**SDS:** dodecilsulfato de sodio

**SDS-PAGE:** SDS- policramide gel electrophoresis

**SFB:** Suero Fetal Bovino

**Smac:** second mitochondrial activador os caspases

**TBS:** Tampón salino de Tris

**TNF:** factor de necrosis tumoral

**TNFR1:** Receptor 1 del factor de necrosis tumoral

**TNFR2:** Receptor 2 del factor de necrosis tumoral

**TRADD:** TNF-R1 dominio asociado la muerte

**TRAIL:** ligando inductor de apoptosis relacionada con el TNF

## RESUMEN

En la provincia de Loja se prepara una bebida llamada “horchata” que incluye hasta 71 plantas medicinales, que varían de 16 a 32 especies, se le atribuye varias propiedades y se cree que la mezcla podría tener capacidad antitumoral. El objetivo del estudio fue determinar si 9 distintas mezclas de horchatas (denominadas como **H**) que difieren en porcentaje y variedad de plantas, causan citotoxicidad en líneas tumorales y que mecanismo de muerte inducen, y si existe algún efecto en células normales. El ensayo de citotoxicidad a dosis de 50µg/ml indicó una inhibición mayor al 30% en astrocitoma cerebral (D-384) de **H1, H2, H7, H8** y **H9** y no existió un efecto citotóxico en células inmortalizadas de ovario de hámster chino (CHO-K1) ni en linfocitos. El rango de la IC<sub>50</sub> de las horchatas efectivas fue de 41 a 122 µg/ml. Las **H1, H7** y **H9** en células D-384 inducen a apoptosis, detención del ciclo y daño genotóxico, vías moduladas por la fosforilación de p53/p73. La horchata podría ser utilizada como un posible fitofármaco para el tratamiento del cáncer de cerebro.

**PALABRAS CLAVE:** horchata, astrocitoma cerebral, apoptosis.

## ABSTRACT

In the province of Loja is prepared a drink called "horchata" that includes up to 71 medicinal plants, ranging from 16 to 32 species, is attributed several properties and it is believed that the mixture could have antitumor capacity. The objective of the study was to determine if 9 different "horchata" mixtures (denominated as **H**) that differ in percentage and variety of plants, cause cytotoxicity in tumor lines and which mechanism of death induce, and if there is any effect in normal cells. The cytotoxicity assay at 50µg / ml indicated a greater than 30% inhibition of **H1, H2, H7, H8** and **H9** cerebral astrocytoma (D-384) and there was no cytotoxic effect on immortalized chinese hamster ovary cells (CHO-K1) or lymphocytes. The IC<sub>50</sub> range of effective "horchatas" was 41 to 122 µg / ml. **H1, H7** and **H9** in D-384 cells induce apoptosis, cycle arrest and genotoxic damage, pathways modulated by p53 / p73 phosphorylation. "Horchata" could be used as a potential phytopharmaceutical for the treatment of brain cancer.

**KEYWORDS:** horchata, cerebral astrocytoma, apoptosis.

## INTRODUCCIÓN

El cáncer designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, caracterizado por la multiplicación rápida de células anormales y éstas podrían extenderse e invadir partes adyacentes del cuerpo causando metástasis (World Health Organization, 2012). Además es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, en el 2012 hubo 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (Torre et al., 2015; World Health Organization, 2012). Los cánceres diagnosticados con más frecuencia son: pulmón, colon y recto, estómago, hígado, mama, cuello uterino y próstata (World Health Organization, 2012) y no tan frecuentes pero con mayor agresividad los de cerebro o del sistema nervioso central. En el Ecuador la incidencia de los tumores malignos de ojo, cerebro y sistema nervioso central representan el 2.2% en hombres y 1.1% en mujeres (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2011). Un tipo de cáncer de cerebro es el glioblastoma o también llamado “astrocitoma de grado IV”, este representa cerca del 17% de todos los tumores cerebrales primarios y entre el 60 y el 75% de todos los astrocitomas, su tratamiento es difícil por lo que actualmente se realiza una combinación de cirugía, quimioterapia y radiación (American Brain Tumor Association, 2012).

Hoy en día, el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer ha aumentado, pero la complejidad de los tumores se mantiene, adquiriendo resistencia a quimioterapéuticos conocidos, siendo incapaces de eliminar eficazmente a las células cancerosas (Bailon-Moscoso et al., 2015). Investigaciones demuestran que plantas con diversos usos han presentado una capacidad anticancerígena específica y eficaz, por lo que el descubrimiento de nuevos fármacos de origen natural con múltiples mecanismos de acción sería una alternativa contra el cáncer. Se estima que el 80% de las personas emplean la medicina tradicional para el cuidado de su salud (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010; Munoz & Cuca, 2015), utilizando partes de las plantas para realizar tinturas, maceraciones, infusiones entre otros preparados.

En el Ecuador y comúnmente en la provincia de Loja las plantas medicinales son una alternativa natural para tratar varias dolencias (Carrión, 2012). además de ello, en los hogares lojanos se prepara una bebida a base de una mezcla de ciertas plantas conocida como “horchata” (Carrión, 2012; Rios, Tinitana, Jarrín-V, Donoso, & Romero-Benavides, 2017), se registran hasta 71 especies que incluyen 33 familias y 58 generos, 38 especies son las más usadas dependiendo de la distribución geográfica y la disponibilidad durante el invierno o el verano (Rios et al., 2017), también gran parte de los expendedores las comercializan en un “tongo”. (Carrión, 2012; Cerón, 2006; Cumbajín, 2008; Rios et al., 2017; Santos, 2015; Tinitana, 2014; Villamagua, 2014; Vivanco, 2014). Cada manojo de plantas medicinales

vendidas para preparar “horchata” puede variar de 16 a 32 especies (Rios et al., 2017). A ésta bebida se le atribuyen propiedades como: antiestrés, antioxidante, antígenotóxica (Palacio-Arpi, 2016), tónico cerebral y para la memoria (Villamagua, 2014), diurético, hidratante, digestiva, energizante (Tinitana, 2014), cicatrizante, para inflamaciones del hígado, riñones y ovarios (Villamagua, 2014). Estudios previos indican que los antioxidantes previenen la iniciación, promoción y la progresión del tumor, por lo que su acción anticancerígena se puede dar por una combinación de efectos protectores en células normales y por otro lado de efectos citotóxicos en células neoplásicas (Ramos, 2008), dado por la eliminación de estas células mediante distintos tipos de muerte celular como son apoptosis, necroptosis, autofagia, catástrofe mitótica entre otras.

Un rasgo común de todas las formas de cáncer es la inoperancia de los mecanismos que regulan normalmente el crecimiento, la proliferación y la muerte celular (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010), pues la inactivación o sobreexpresión de ciertas proteínas de estas rutas llevan a que la célula se prolifere de manera incontrolada y evada la muerte (Hanahan & Weinberg, 2011). Ciertos extractos de plantas o metabolitos secundarios presentes en ellas pueden activar a proteínas induciendo muerte celular a células tumorales, principalmente por apoptosis.

Las células que están muriendo por apoptosis adquieren ciertas características que pueden ser detectadas como la distribución de la fosfatidilserina la cual se encuentra en la membrana celular orientada hacia el exterior en células en apoptosis (Moreno, Garcia, & Dueñas, 2000) y es altamente afín a anexina V, además la detección de las proteínas implicadas en la ruta de muerte es importante, dado que confirma el proceso apoptótico, pues cuando la células reciben un estímulo de muerte (daño al ADN o señales de estrés celular) interviene p53 y/o p73 tomando dos caminos: activar a proteínas que inhiben a CDK (quinasas dependientes de ciclina) como p21, deteniendo el ciclo celular, dando tiempo para que la maquinaria de reparación haga su trabajo, por un posible daño genotóxico, y por otro lado activa a proteínas pro-apoptóticas (Bax y regulación negativa de Bcl-2), pues si el daño es irreparable o demasiado tarde, las células entran inevitablemente a apoptosis (Guamán, 2012). Con estos antecedentes es imprescindible conocer en profundidad todos los mecanismos de muerte celular y proteínas implicadas, tanto en células sanas como tumorales, para encontrar tratamientos contra el cáncer (Maldonado, 2010).

Por ello través de este estudio se pretende investigar si la mezcla de las plantas utilizadas para elaborar la horchata produce un efecto citotóxico en células normales y líneas tumorales; establecer la  $IC_{50}$  y el probable mecanismo de muerte celular en la línea más sensible al tratamiento con estas horchatas.

## **CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO**



## 1.1 **Cáncer.**

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que puede afectar a cualquier parte del organismo (World Health Organization, 2012). Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que pueden formar masas no cancerosas rodeadas de una membrana llamados como tumores benignos, o cancerosos denominados tumores malignos (Sociedad Americana contra el Cáncer, 2016) éstas pueden extenderse a partes adyacentes del cuerpo o a otros órganos, proceso conocido como metástasis (World Health Organization, 2012). Un rasgo común a todas las formas de cáncer es la inoperancia de los mecanismos que regulan normalmente el crecimiento, la proliferación y la muerte celular (Loraine & Mendoza-Espinoza, 2010). Se proponen 10 alteraciones de las células que marcan su potencial canceroso: 1) Señalización de proliferación mantenida, 2) Desregulación de la energía celular, 3) Resistencia a la muerte celular, 4) Inestabilidad y mutaciones del genoma, 5) Angiogenesis inducida, 6) Evasión de supresores del crecimiento, 7) Evasión de la respuesta inmune, 8) Inmortalidad replicativa, 9) Respuesta inflamatoria promotora de tumores y 10) Invasión y metastasis (Hanahan & Weinberg, 2011).

### 1.1.1 **Causas.**

El cáncer puede desarrollarse por la interacción entre factores genéticos y la exposición a agentes externos físicos como las radiaciones ultravioleta e ionizantes; químicos, como componentes del humo de tabaco, aflatoxinas o el arsénico; biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos (World Health Organization, 2012); y factores internos, tales como mutaciones genéticas heredadas, hormonas, y condiciones inmunes. Estos factores pueden actuar juntos o en secuencia para producir cáncer (American Cancer Society, 2015b).

El envejecimiento es otro factor fundamental en la aparición del cáncer. La incidencia de esta enfermedad aumenta con la edad, muy probablemente porque se van acumulando factores de riesgo de determinados tipos de cáncer. La acumulación general de factores de riesgo se combina con la tendencia que tienen los mecanismos de reparación celular a perder eficacia con la edad (World Health Organization, 2012).

### 1.1.2 **Incidencia del cáncer.**

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo; en 2012 hubo 14 millones de nuevos casos y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (Torre et al., 2015; World Health Organization, 2012), para el 2017 se estima

1,688780 nuevos casos de cancer y 600920 muertes por cancer (American Cancer Society, 2015a).

El cáncer de pulmón y mama son frecuentemente diagnosticados y las principales causas de muerte en hombres y mujeres, respectivamente. En el Ecuador para el año 2012 con una población 14.86 millones de habitantes, el número estimado de nuevos casos de cáncer fueron de 23360 (Torre et al., 2015). Otros cánceres diagnosticados con mayor frecuencia en hombres fueron de hígado, estómago, colon y recto; y en mujeres de estómago, cuello uterino y colon (Torre et al., 2015; World Health Organization, 2012).

Otros tipos de cáncer que no son tan frecuentes pero representan mayor agresividad, como el cáncer de cerebro, constituye la segunda causa principal de muerte en niños (varones y mujeres) menores a 20 años y en varones mayores de 45 años. En Estados Unidos se registraron aproximadamente 66290 nuevos casos de tumores cerebrales primarios, esta cifra incluye tanto malignos (24070) como no malignos (40470), en el año 2012. (American Brain Tumor Association, 2012). En el Ecuador la incidencia de los tumores malignos de ojo, cerebro y sistema nervioso central representan el 2.2% en hombres y 1.1% en mujeres (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2011).

## **1.2 Cáncer de cerebro.**

A la masa de células que crece en el cerebro o el conducto vertebral se denomina tumor cerebral. Existen dos tipos de tumores cerebrales: primarios y metastásicos. Los tumores cerebrales primarios comienzan en el cerebro y tienden a permanecer en el mismo mientras que los tumores cerebrales metastásicos empiezan como un cáncer en otra parte del organismo y se propagan hacia el cerebro (American Brain Tumor Association, 2012).

Los tipos de cáncer que se propagan con frecuencia al cerebro son: cáncer de pulmón, mama, riñón, colon y piel (melanoma).

### **1.2.1 Astrocitoma.**

Los astrocitomas son tumores cerebrales que surgen de los astrocitos (células que conforman el tejido “pegajoso” o conectivo del cerebro). El sistema de la OMS gradúa a los astrocitomas en una escala de I a IV.

El astrocitoma de grado I, son tumores bien definidos y no infiltrantes, tienden a permanecer en el área en la que comenzaron a desarrollarse y no se extienden al tejido circundante, representan aproximadamente del 5 al 6% de todos los gliomas y es más común en niños. El

astrocitoma de grado II, es un tumor que ha desarrollado un suministro de sangre alrededor de sí mismo, cuando el tumor contiene células muertas (necrosis) requiere un tratamiento más agresivo. Un astrocitoma de grado III tiende a tener proyecciones que crecen dentro del tejido circundante, dificultando la extirpación completa durante la cirugía. Si se los extirpa por cirugía tienden a volver a aparecer y cuando lo hacen, podrían crecer como un tumor de grado IV. El glioblastoma también llamado “astrocitoma de grado IV” o “GBM” representa cerca del 17% de todos los tumores cerebrales primarios y entre el 60 y el 75% de todos los astrocitomas, generalmente se encuentra en los hemisferios cerebrales, y rara vez en cualquier parte del cerebro o la médula espinal. Debido a que los glioblastomas pueden crecer rápidamente, los síntomas más comunes se deben a un aumento de la presión en el cerebro y pueden incluir dolor de cabeza, náuseas, vómitos y somnolencia. Su frecuencia aumenta con la edad y afecta a más hombres de 45 años en adelante (American Brain Tumor Association, 2012).

### **1.3 Tratamiento para astrocitoma cerebral grado IV o “GBM”.**

La mayoría de tumores cerebrales presentan un componente sólido y otro difuso, con una extensión que varía y es difícil de identificar. El componente sólido, casi siempre, puede operarse y eliminarse, en casos de gliomas de grado I, mientras que tratar glioblastoma multiforme es mucho más complejo, debido a una combinación entre la radiación y quimioterapia, ya que este tipo de tumor presenta un componente difuso que es difícil de eliminar completamente, por ello es que vuelve a crecer, la causa principal es la falta de células exactamente iguales en los extremos (forma de tentáculos), por lo que un tipo de célula podría responder al tratamiento y los demás tipos podrían ser resistentes (American Brain Tumor Association, 2012).

#### **1.3.1 Cirugía.**

Los objetivos de la cirugía son: extirpar todo el tumor contenido en un sitio, reducir el tumor sin extirpar todo debido a que se podría dañar un órgano, aliviar los síntomas del cáncer ya que el tumor está causando dolor o presión (Instituto Nacional del Cáncer, 2015a).

Si el tumor cerebral se encuentra cerca de estructuras importantes como el centro del lenguaje o el área motora, extirpar la mayor cantidad del tumor podría verse muy limitada, por lo que, se realizaría una extirpación parcial del tumor para disminuir la inflamación en el cerebro o para reducir la actividad convulsiva (American Brain Tumor Association, 2012).

Si la cirugía dejó pocas células en el lugar del tumor se procede a utilizar radiación y quimioterapia para tratar el tumor remanente.

### **1.3.2 Radioterapia.**

La radioterapia (también llamada terapia con rayos X o irradiación) es el uso de un tipo de energía (denominada radiación ionizante) que lesiona o destruye las células en el área que recibe tratamiento, daña su material genético y haciendo imposible que crezcan y se dividan las células. La radiación generalmente se dirige al sitio del tumor y al área que lo rodea, en astrocitoma de grado II, III y IV (Instituto Nacional del Cáncer, 2008).

### **1.3.3 Quimioterapia.**

El Instituto Nacional de Cáncer define a un antineoplásico como un compuesto “*que impide la formación de neoplasias (crecimientos que se pueden volver cancerosos)*”. Estos se utilizan en la quimioterapia, que está basada en la administración intravenosa de fármacos antineoplásicos que producen efectos citotóxicos en las células del cáncer, teniendo la capacidad de inhibir el crecimiento tumoral y/o provocar la muerte celular (Guamán, 2012). Es empleada como tratamiento cuando el tumor se encuentra en las etapas II, III y/o IV (Beresi & Del Pozo, 1976), principalmente para reducir las posibilidades de que regrese el cáncer, además evitar que se extienda o para hacer lento su crecimiento y por último para aliviar los síntomas del cáncer (ocurre cuando se reduce el tamaño del tumor que está causando dolor o presión) (Instituto Nacional del Cáncer, 2007, 2015b).

En la actualidad el fármaco quimioterapéutico usado con mayor frecuencia en adultos con glioblastoma, es la temozolomida; sin embargo también se están probando otros fármacos. Muchos de los estudios combinan la temozolomida con otros fármacos que tienen acciones biológicas diferentes, como aquellos que afectan el crecimiento de los vasos sanguíneos o los fármacos que interfieren con las proteínas creadas por el tumor. Algunos médicos administran antes de la radioterapia ciertos fármacos para maximizar el efecto radiosensibilizador, que significa sensibilizar al tumor antes de administrar una radiación (American Brain Tumor Association, 2012).

### **1.4 Metabolitos secundarios de plantas.**

Los compuestos químicos responsables de la actividad farmacológica son conocidos como metabolitos secundarios que se sintetizan de forma natural y se acumulan en un número limitado de plantas de distintas especies y en diferentes concentraciones, pueden presentar propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Ávalos & Elena, 2009).

El potencial de las plantas para curar enfermedades es conocido por distintas poblaciones y este conocimiento ha sido aplicado en la medicina tradicional (Lorraine & Mendoza-Espinoza, 2010)..

### **1.5 Medicina tradicional.**

En todo el mundo, el uso de plantas con propiedades farmacológicas es el principal recurso médico (Scovassi & Guamán, 2013). Esta práctica se conoce como medicina tradicional, de acuerdo a la OMS, *“la medicina tradicional incluye conocimientos, habilidades y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias adecuadas de las diferentes situaciones, aplicadas a la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento tanto físico como mental”* (World Health Organization, 2012). Implica el uso de muchos productos a base de hierbas que contienen todo tipo de plantas y de ellas partes específicas (hojas, raíces, tallos, frutos, flores, semillas, ramas y cortezas) (Vasquez, Alva, & Marreros, 2001) que se pueden utilizar en una infusión, tintura, maceración, extracto, decocción, compresas, inhalación o como especialidad terapéutica en base de determinadas sustancias contenidas en ellas (Urbina, 2012). La OMS define a las plantas medicinales como *“cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos”* (Lorraine & Mendoza-Espinoza, 2010; World Health Organization, 2002).

A lo largo de la historia los asiáticos, africanos, árabes, nativos americanos, oceánicos, centroamericanos y sudamericanos han desarrollado una gran variedad de sistemas de medicinas tradicionales (World Health Organization, 2002). Las culturas indígenas utilizaban las hierbas para rituales de curación, incluso en las escrituras chinas y jeroglíficos egipcios se describían los usos medicinales de las plantas (Motaleb, 2011). Hoy en día muchos países utilizan la medicina tradicional debido al bajo costo y acceso limitado a los tratamientos farmacéuticos, y se estima que el 80% de las personas emplean esta práctica para el cuidado de la salud (Alberto et al., 2010).

En la región sur del Ecuador, existen grupos de indígenas, que conservan los conocimientos ancestrales heredados de generación en generación, estos pueblos también han mantenido la biodiversidad en sus “huertos familiares” obteniendo una seguridad alimentaria para la familia, y réditos económicos (Carrión, 2012). Ellos cultivan plantas medicinales para curar varias dolencias y/o enfermedades.

### **1.6 Horchata.**

En América Latina, el término "horchata" es utilizado para identificar una amplia variedad de bebidas, ya que sus ingredientes son diferentes en cada país e incluso a nivel nacional. Ha

existido en el sur del Ecuador desde la colonia española, y ha sido tradicionalmente preparada con plantas medicinales de producción local (De la Torre, Alarcón, Kvist, & Salazar, 2008; Rios et al., 2017). Es muy conocido en la provincia de Loja que las hierbas medicinales sean una alternativa natural para tratar varias dolencias (Carrión, 2012). Los hogares lojanos adquieren, frecuentemente en los mercados y abastos de la ciudad, una gran cantidad de plantas, para preparar una bebida a manera de infusión llamada horchata, también conocida como “agua de frescos” (Rios et al., 2017), “agua que cura” (Carrión, 2012; Rios et al., 2017; UTPL, 2013) o “bebida curativa de varios males” (Carrión, 2012). Las plantas elegidas varían (Cerón, 2006) y gran parte de los expendedores las comercializan en un “tongo” que incluye las especies para elaborarla, esta es una bebida de color rosa que se consume como remedio antiinflamatorio, como refresco, o como una infusión equivalente al té o café (Cerón, 2006). La importancia cultural de esta bebida es tal que también se expende en locales comerciales en fundas o paquetes de 50 o 100 g la mezcla de plantas seca y triturada, así como las típicas bolsitas de hierbas (Carrión, 2012). Se le puede agregar ingredientes adicionales como limón, azúcar, sábila entre otros (Palacio-Arpi, 2016). A esta bebida se le atribuyen propiedades como: antiestrés, antioxidante, antígenotóxica (Palacio-Arpi, 2016), tónico cerebral y para la memoria (Villamagua, 2014), diurético, hidratante, digestiva, energizante (Tinitana, 2014), cicatrizante, para inflamaciones del hígado, riñones y ovarios (Villamagua, 2014). Para la preparación de la horchata se reportan hasta 71 especies, las mezclas más comunes pueden contener de 16 a 32 especies, dependiendo de su disponibilidad espacial y temporal (Rios et al., 2017). Las especies que componen a la horchata a menudo le proporciona aroma (*Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton, *Cymbopogon citratus* Stapf, *Mentha x piperita* L. y/o *Mentha spicata* L.), color (*Amaranthus hybridus* L. y/o *Iresine herbstii* Hook.), y sabor (*Borago officinalis*, *Dianthus caryophyllus*, *Equisetum bogotense* Kunth, *Foeniculum vulgare* P. Mill, *Fuchsia hybrida*, *Matricaria recutita* L., *Melissa officinalis* L., *Pelargonium graveolens* L'Herit. y *odoratissimum*, *Plantago major* L., y *Triumfetta semitriloba* Lam.) (Carrión, 2012; Cerón, 2006; Rios et al., 2017; Tinitana, 2014).

Los usos terapéuticos generales y según Rios *et al* (2017) de las especies utilizadas para realizar las distintas horchatas se indican en el Anexo 1.

### **1.7 Tipos de muerte celular.**

Las células del organismo no viven indefinidamente y su vida media depende del tipo celular. Hay células cuyo ciclo de vida es largo, como las neuronas y las musculares, mientras que la vida de otras es transitoria, como algunas células epiteliales y sanguíneas, que se renuevan a partir de sus células progenitoras. Las células que componen un tejido en un organismo adulto permanece, dentro de ciertos límites, constante; las células que mueren se reemplazan

por otras, proceso que está regulado y que asegura el mantenimiento de un balance adecuado (homeostasis) entre la pérdida, la renovación y la diferenciación celular. Para ello, existe una complejidad de procesos que están implicados en el mantenimiento, sin embargo un daño irreversible puede hacer que se alcance un punto sin retorno con cambios morfológicos, funcionales y bioquímicos que imposibilitan a las células realizar sus funciones vitales y las llevan a la muerte. La muerte de las células puede desencadenarse por múltiples causas: daño mecánico, pérdida de su función, infección por virus o microorganismos, acción de agentes citotóxicos o la falta de nutrientes (Lizarbe, 2007). Existen varios tipos de muerte celular entre ellos están: apoptosis, necrosis, necroptosis, senescencia, catástrofe mitótica, oncosis, piroptosis entre otras.

### 1.7.1 Apoptosis.

El término apoptosis se deriva de las palabras griegas "*apo*" y "*ptosis*", lo que significa: "*La caída de las hojas en otoño*", y está estrechamente relacionado con el proceso en el que las células dañadas se separan del tejido sano a morir de forma discreta y evitan efectos tales como la inflamación (Wong, 2011). La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que es caracterizado por la formación de ampollas en la membrana celular, contracción celular, fragmentación nuclear y la condensación de la cromatina (Berghe et al., 2009; Sánchez & Diosdado, 2003; Wong, 2011). Además es una muerte fisiológica que se puede presentar por dos vías bien caracterizadas en las células: la vía extrínseca y la vía intrínseca, donde la célula no pierde la integridad de la membrana y solo la pierde en final del proceso. La vía extrínseca, se activa para eliminar células no deseadas durante el desarrollo animal, se inicia por la activación inducida por ligando de los receptores de muerte en la membrana plasmática. Si la célula sufre un daño irreparable (Moreno et al., 2000) o por señales de estrés celular tal como el daño al ADN se desencadena la vía intrínseca. La apoptosis es un proceso coordinado, que se da por la activación de un grupo de cisteín proteasas llamadas caspasas (López et al., 2012) donde se requiere de una cascada de activación secuencial de caspasas iniciadoras (2, 8, 9 y 10) y efectoras (3, 6 y 7) (Bao & Shi, 2007).

La apoptosis o muerte celular programada se lleva a cabo en cuatro etapas:

1. **Inicio:** la apoptosis puede ser desencadenada por diferentes señales intra o extracelulares, un factor puede ser el estrés biológico el cual provoca la liberación de citocromo C de la mitocondria (vía intrínseca), mientras que otras señales se dan por la unión de ligandos como FasL (Fas ligando), TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral), TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionada con el TNF) a receptores como Fas R (Fas receptor) presente en la membrana plasmática de la célula blanco (vía

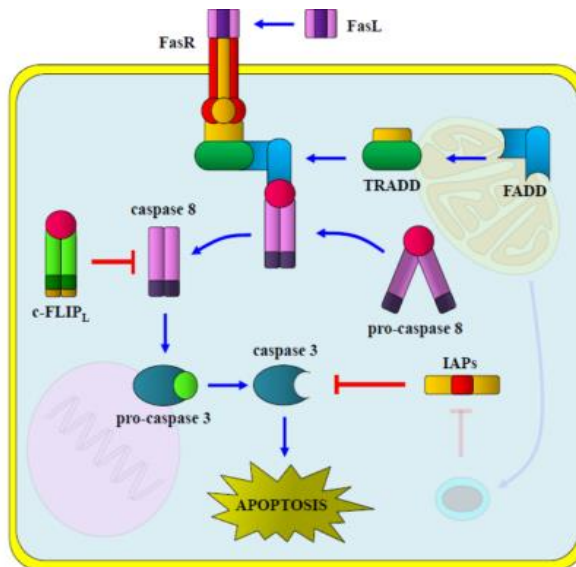
extrínseca) seguido por el reclutamiento de TRADD (TNF-R1 dominio asociado la muerte), una proteína citosólica, que posteriormente recluta FADD (Fas dominio de activación de muerte), un adaptador de proteínas responsable de la dimerización y activación de la caspasa 8 (Guamán, 2012; Sánchez & Diosdado, 2003).

- 2. Decisión:** un posible daño del ADN inducido por radiación, quimioterapia, oncogenes, hipoxia o estrés ribosomal, estimula la sobreexpresión de p53. Por lo tanto, esta proteína se acumula en el núcleo para regular la expresión de otros genes que codifican proteínas pro-apoptóticas y por otro lado la maquinaria reparación con el fin de decidir si vivir o morir (Guamán, 2012). Un factor de transcripción implicado en esta decisión como antes se lo menciono es p53, se lo conoce como el "ángel" guardián del genoma humano, siendo la principal proteína supresora de tumores, que pueden llevar a una detención del ciclo celular, senescencia o apoptosis (Aramayo et al., 2011; Hanahan & Weinberg, 2011), a través de la expresión o sobre expresión de proteínas tales como CIP (CDK Inhibidor de Proteínas), una familia de proteínas que inhiben a CDK (quinasas dependientes de ciclina), incluyendo p21, que detienen el ciclo celular en la fase G1 para inhibir el crecimiento celular, la reparación del daño o conducir a la muerte (Guamán, 2012; Hanahan & Weinberg, 2011).

Si el daño es irreparable o demasiado tarde, las células entran inevitablemente a apoptosis, mediante dos vías:

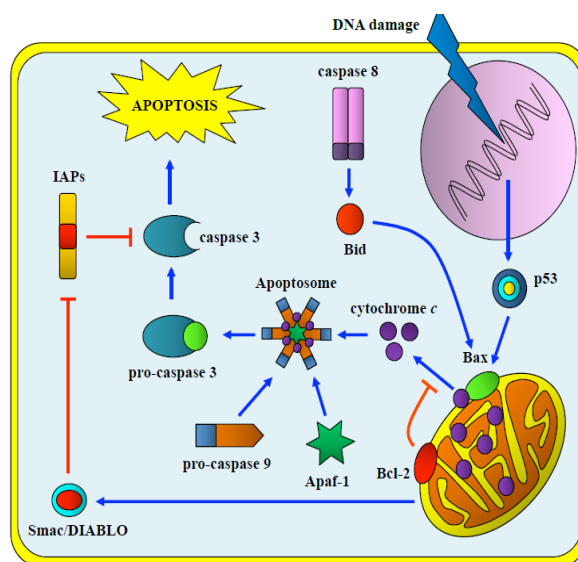
**Vía extrínseca:** representada en la Figura 1, el complejo de proteína ligando (FasL) – receptor (FasR)-adaptador (FADD-TRADD) es conocido como el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), este inicia el montaje y la activación de pro-caspasa 8, la forma activada de caspasa 8, inicia la apoptosis escindiendo otras caspasas aguas abajo (Wong, 2011). Existe una homología que presenta FLIP con la caspasa 8, la cual interfiere con la activación al unirse al complejo Fas-FADD, inhibiendo así la unión de la pro-caspasa 8 y con ello su procesamiento (Sánchez & Diosdado, 2003). Las IAPs también inhiben a las caspasas 3, 7 y 9 al igual que en la vía intrínseca.





**Figura 1 .** Vía extrínseca de la apoptosis.  
**Fuente:** (Guamán, 2012)

**Vía intrínseca:** representada en la Figura 2, la caspasa 8 activa a Bid (miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2) y a Bax induciendo a la liberación del citocromo C al citosol y este se une a Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1) de la mitocondria y en presencia a ATP se forma el complejo conocido como apoptosoma, el cual recluta y activa a la pro-caspasa 9, la cual puede a su vez activar a las caspasas 3, 6 y 7 (Placzek et al., 2010; Sánchez & Diosdado, 2003). La Bcl-2 es una proteínas anti apoptoticas que participa en la regulación de la apoptosis al controlar la permeabilidad mitocondrial, mientras que Bid y Bax se translocan a la mitocondria donde promueven la liberación de citocromo C (Placzek et al., 2010).



**Figura 2.** Vía intrínseca de la apoptosis.  
**Fuente:** (Guamán, 2012)

**3. Ejecución:** la célula ha decidido la muerte celular, por lo que se producen cambios bioquímicos que dan lugar a la degradación de proteínas y la cromatina (Fink & Cookson, 2005). Por un lado las caspasas 3, 6 y 7 son las responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en las células apoptóticas ya que entre sus sustratos se encuentran proteínas del citoesqueleto, de la membrana celular y las encargadas de la reparación del ADN (Sánchez & Diosdado, 2003). Por otro lado el ADN es escindido por varios tipos de DNAsas, endonucleasas, DFF (factor fragmentación del ADN), CADs (ADNasas caspasa-activado) y L-ADNasa II (ácido, DNasa independiente de cationes II) que cortan a nivel de nucleosomas, y fragmenta el ADN. Por tanto la división de ADN impide que se desencadenen respuestas antigénicas de la cromatina en el espacio extracelular y se facilita la fagocitosis. Del mismo modo, los factores de transcripción de ADN y factores de traducción de proteínas también se escinden por las caspasas para inhibir la proliferación celular. Las proteínas de membrana en el retículo endoplásmico (ER) también son sustratos de caspasa, siendo degradados y desactivando la síntesis de proteínas. Las mitocondrias, a través del efecto de Bax y Bid, así como en ER y lesiones complejo de Golgi, aumentan su permeabilidad a través de la liberación de citocromo c, que ayuda a la activación de caspasas. En consecuencia, esta permeabilidad también permite la entrada de agua y otros solutos que aumentan el volumen de las mitocondrias haciéndolos más frágiles y susceptibles a la degradación (Guamán, 2012).

Finalmente la célula genera un número variable de vesículas de diferentes tamaños rodeados de membrana plasmática, que contiene parte de la cromatina y de los orgánulos celulares. Estas vesículas se denominan cuerpos apoptóticos (Sánchez & Diosdado, 2003). Tanto en la vías extrínseca e intrínseca el resultado es la activación de la caspasa 3, que promueve varios cambios morfológicos en el proceso de apoptosis donde las células no pueden escapar de la muerte (Guamán, 2012).

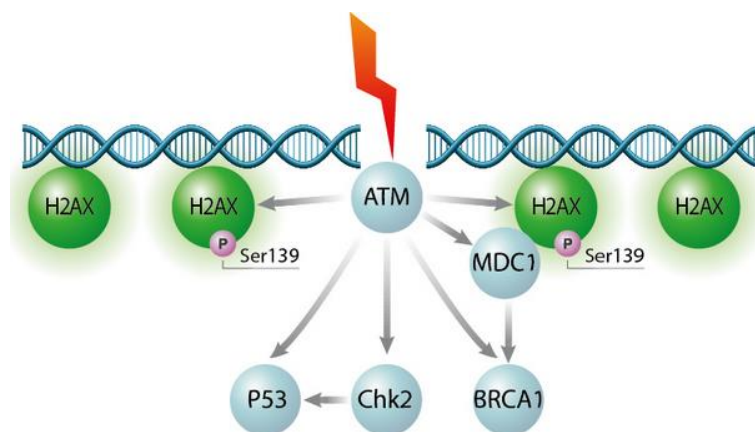
**4. Recolección:** Los responsables de retirar la mayoría de las células apoptóticas son los fagocitos. Uno de los mecanismos de reconocimiento para que las células sean fagocitadas, es que siempre está presente es la pérdida de la simetría de la membrana celular, la cual tiene como consecuencia la exposición en la membrana externa de las moléculas de fosfatidilserina (FS), que de manera normal está restringida a la parte interna (Sánchez & Diosdado, 2003).

## 1.8 Regulación de rutas implicadas en el proceso de muerte celular.

El mantenimiento de la integridad del genoma y la homeostasis celular en las células humanas están regulados por una intrincada red de vías que incluyen puntos de control.

### 1.8.1 Daño genotóxico.

La exposición a agentes genotóxicos da como resultado una activación de vías que sirven para promover la supervivencia celular eliminando la lesión genómica. Las células que experimentan un grado de daño del ADN que está más allá de la reparación pueden morir principalmente por apoptosis.



**Figura 3.** Fosforilación de H2AX frente a un daño genotóxico.  
**Fuente:** (Cisbio,2012)

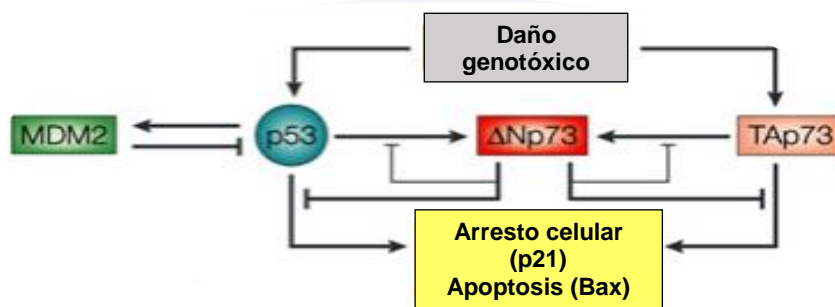
El ADN se envuelve alrededor de varios grupos de histonas, por tanto estas proteínas contribuyen en la estructura del ADN, la H2AX es una variante de la familia de la histona H2A. En la Figura 3 se indica que cuando ocurre una ruptura de doble cadena de ADN causada por procesos endógenos o factores exógenos (por ejemplo, radiaciones ionizantes y UV, medicamentos anticancerosos específicos), se activa ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated), un miembro de la familia de proteínas quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K), la cual fosforila a H2AX en su residuo de Ser139 y esta modificación se extiende a las demás proteínas H2AX que están en la proximidad del sitio de daño, la fosforilación es crucial para activar la vía de respuesta al daño del ADN y dar lugar a la reparación (Bucher & Britten, 2008).

ATM también activa a proteínas que inhiben a las CDK (p21) y fosforila a miembros de la familia de p53, que son responsables de la detención del ciclo celular o apoptosis si el daño no puede ser reparado (Mirzayans, Andrais, Scott, Wang, & Murray, 2013). Del mismo modo p73 también puede ser activado por el daño del ADN, y esto desencadenar la muerte celular, independientemente del estado de p53. Los mecanismos moleculares por los que se activa p73 implica a ABL (Abelson tyrosine kinase).

### 1.8.2 Familia de p53.

p53 es un supresor de tumor que modula la transcripción de factores que determinan la detención del ciclo celular, reparación del ADN y muerte celular por apoptosis, en respuesta a las señales de estrés. Los dos homólogos de p53: p63 y p73, desempeñan un papel importante en el desarrollo, pero también actúan como supresores tumorales.

MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) es un importante regulador negativo de p53 (C. Chen, Hu, Luo, Zhu, & Zhou, 2013), por lo que, el aumento de los niveles de MDM2 puede inactivar las funciones de p53 (ubiquitina y degrada a p53)(Melino, Laurenzi, & Vousden, 2002).



**Figura 4:** Regulación de la familia de p53.  
**Fuente:** (Melino et al., 2002)

Un daño en el ADN causa la activación de los miembros de la familia de p53 mediante distintas modificaciones postraduccionales que modulan la actividad transcripcional, alterando la estabilidad de la proteína y, por lo tanto, su actividad, en respuesta a señales de estrés particulares. La vía de ATM y ABL causan la fosforilación en Ser46 en p53 y Y99 en p73 respectivamente, esto es importante para la orientación a los promotores pro-apoptóticos (Scoumanne, Harms, Chen, Harms, & Chen, 2017) como Bax y PUMA (p53-Upregulated Modulador of Apoptosis) (transactiva a Bax) conduciendo a la permeabilización de la membrana mitocondrial, permitiendo la salida del citocromo C al citosol, formando el apoptosoma, que finalmente activa las caspasas efectoras y da lugar a la muerte por apoptosis (Guamán, 2012).

En la Figura 4 se observa la regulación de las proteínas pertenecientes a la familia de p-53, por un lado el gen TP73 codifica dos proteínas diferentes que se expresan bajo el control de dos promotores independientes, y que tienen actividades opuestas: el TAp73 transcripcionalmente activo y el ΔNp73 que tienen un efecto dominante negativo sobre la actividad transcripcional de la p73 y p53, inhibiendo el arresto celular y la promoción de la

apoptosis. Y por otro lado, p53 y p73 a su vez transactivan a  $\Delta Np73$  regulando su propio promotor para controlar finalmente los niveles de proteína en estado estacionario (Melino et al., 2002).

## **1.9 Ensayo de citotoxicidad.**

### **1.9.1 Citotoxicidad.**

La citotoxicidad se define como *“una alteración de las funciones celulares básicas que conlleva a que se produzca un daño que pueda ser detectado”* (Arencibia, Rosario, & Curveco, 2003).

Utilizando modelos biológicos como líneas celulares, cultivos primarios u órganos aislados (Arencibia et al., 2003) expuestos a compuestos, se puede detectar el potencial citotóxico, teniendo en cuenta que estos serán utilizados como fármacos, cosméticos y deben demostrar que no son tóxicos o porque van a ser usados como agentes anti cáncer donde la citotoxicidad es crucial para su acción (Freshney, 2011;p-365)

### **1.9.2 Ensayo de proliferación celular (MTS).**

El ensayo de proliferación celular se ejecuta normalmente días después de la exposición de las células a un agente dañino y se ven influidas no sólo con la muerte celular, sino también por los cambios en la tasa de crecimiento celular. Como muchos de los mismos genes que influyen en la muerte celular también influyen en la proliferación celular, especialmente en el caso de la apoptosis, es difícil o imposible interpretar la sensibilidad global del tratamiento de estos tipos de ensayos (Tiwari, 2011). El (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) es una sal de tetrazolio color amarillo que se reduce en formazán por NADH producida por enzimas deshidrogenasas en las células metabólicamente activas. El MTS al ser una sal, es soluble en el medio de cultivo, evitando la formación de cristales, y permitiendo la lectura directamente después de su exposición (Promega, 2012). El incremento de la cantidad de formazán producido en el sobrenadante de cultivo se correlaciona directamente con el número de células vivas (Mosmann, 1983). El método ha sido empleado exitosamente para monitorear la sensibilidad de células tumorales a agentes quimioterapéuticos.

## **1.10 Biomarcadores.**

En el campo de la toxicología ambiental los marcadores biológicos o biomarcadores son los *“cambios medibles, ya sean estos bioquímicos, fisiológicos o morfológicos, que se asocian a*

*la exposición a un tóxico*” (Lemus, 2015). En este proyecto se evaluará la distribución de la fosfatidilserina y las proteínas implicadas en la ruta de muerte celular, mediante anexina/ioduro de propidio y western blot respectivamente.

### **1.10.1 Biomarcadores apoptóticos.**

La apoptosis se produce a través de una compleja cascada de señalización que está estrechamente regulada en múltiples puntos, hay muchas oportunidades para evaluar la actividad de las proteínas implicadas. Un ensayo puede detectar eventos apoptóticos tempranos (iniciación) y otro ensayo para acontecimientos posteriores (ejecución). El segundo ensayo se utiliza para confirmar la apoptosis.

Los métodos utilizados para la detección de la apoptosis son:

1. Cambios morfológicos o alteraciones citomorfológicas;
2. Degradación o fragmentación del ADN;
3. Evaluación de la simetría o alteraciones de la membrana celular;
4. Detección de caspasas, fragmentación de sustratos, reguladores e inhibidores; y
5. Ensayos mitocondriales (Elmore, 2014; Moreno et al., 2000).

### **1.10.2 Evaluación de la distribución de la fosfatidilserina.**

La anexina y el yoduro de propidio son utilizados en conjunción para determinar si las células están sufriendo apoptosis o necrosis, a través de la evaluación de la integridad de la membrana plasmática (Rieger, Nelson, Konowalchuk, & Barreda, 2011). Para células en apoptosis se evalúa la distribución de la fosfatidilserina la cual se encuentra en la membrana orientada hacia el interior de las células, mientras que cuando una célula entra en proceso de apoptosis uno de los efectos es la exposición de esta molécula en el exterior de la membrana celular, entonces al agregar anexina (la cual es una molécula que no es capaz de difundir a través de la membrana y con alta afinidad por esta) las células con la fosfatidilserina expuesta se encontrarán marcadas con ésta y serán aquellas que estén en apoptosis. La detección se puede acompañar con yoduro de propidio, lo cual permite saber si la integridad de la membrana se ha perdido debido a que este interioriza en células muertas, por lo que todas las células positivas para yoduro estarán muertas. Esto permite conocer si la célula se encuentra en una etapa temprana de muerte o si se encuentra en etapa tardía, en la cual ya se encuentra presente una necrosis (Moreno et al., 2000).

### **1.10.3 Detección de proteínas: técnica de western blot.**

Western blot es una técnica importante utilizada en biología celular y molecular, para la investigación, en cuanto a la identificación de proteínas extraídas de células. Una mezcla de proteínas se separa en base al peso molecular, y por lo tanto por tipo (Mahmood & Yang, 2012), a través de electroforesis en gel de acrilamida donde el dodecilsulfato de sodio (SDS) añadido al gel se une a las proteínas y confiere una carga negativa a cada una de ellas. Las proteínas son transferidas electroforéticamente a un soporte rígido o membrana, dónde quedan inmovilizadas. La membrana se incuba con anticuerpos específicos para la proteína de interés, el anticuerpo primario dirigido contra el epítipo específico de la proteína diana. Tras algunos lavados de la membrana, se incuba con un anticuerpo secundario que se unirá de forma específica al anticuerpo primario, proporcionando una forma de detección. El anticuerpo secundario está conjugado con la enzima peroxidasa (HRP) provocando una reacción enzimática que da como resultado final la emisión de luz. Dicha luz puede ser detectada en una película de rayos X, o de forma digital. La detección de fluorescencia se basa en la captación de luz emitida por sustancias fluoróforas conjugadas con el anticuerpo secundario (Advansta, 2011; Mahmood & Yang, 2012).

Como los anticuerpos sólo se unen a la proteína de interés, sólo una banda debe ser visible. El espesor de la banda corresponde a la cantidad de proteína presente (Mahmood & Yang, 2012)

## **CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO**



## **2.1 Objetivo general del proyecto.**

Determinar la actividad citotóxica en líneas tumorales y células normales expuestas a distintas horchatas expedidas en los tres principales mercados de la ciudad de Loja.

## **2.2 Objetivos específicos del proyecto.**

- Determinar la  $IC_{50}$  en la línea tumoral más sensible al tratamiento con horchata.
- Establecer el probable mecanismo de muerte celular en la línea tumoral más sensible al tratamiento con horchata.

## **CAPITULO III. MÉTODOS**

### **3.1 Obtención y preparación de liofilizados de horchata.**

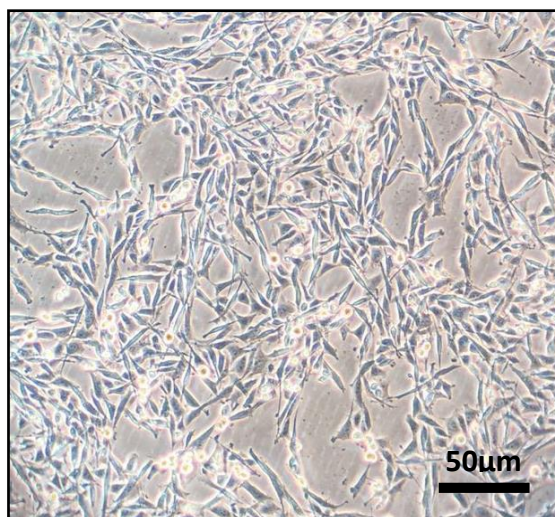
Las plantas medicinales para la preparación de la horchata fueron donadas por la Dra. Fani Tinitana, docente de la Universidad Técnica Particular de Loja, quien las obtuvo de los principales mercados de la ciudad de Loja: Mercado Mayorista, Centro Comercial y Feria libre “Gran Colombia”. A partir de ahora se denominarán a las mezclas de plantas medicinales como: Horchata 1 (**H1**), Horchata 2 (**H2**), Horchata 3 (**H3**), Horchata 4 (**H4**), Horchata 5 (**H5**), Horchata 6 (**H6**), Horchata 7 (**H7**), Horchata 8 (**H8**), Horchata 9 (**H9**). En el Anexo 1 se indica la concentración en porcentaje de las especies medicinales utilizadas para preparar las 9 horchatas.

El liofilizado de las horchatas fue realizado por el Dr. Juan Carlos Romero, para lo cual se pesaron las plantas en fresco y se mezclaron para obtener 1 litro de la bebida, ésta mezcla se sometió a ebullición por un periodo de 5 a 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. En la cabina de flujo laminar se colocó en frascos estériles (500ml) la cantidad de 250ml de horchata y en frascos de 250ml, la cantidad de 125ml. Se dejó en congelación los frascos, con una inclinación de 45° y luego se las colocó en un liofilizador (LABCONCO modelo 7754047) por 48 horas aproximadamente hasta obtener el extracto liofilizado. Se colocaron las muestras liofilizadas de horchata en tubos eppendorf de 1.5ml y se los almacenó en refrigeración (Palacio-Arpi, 2016).

Las concentraciones madre (1000µg/ml) de cada horchata se prepararon con medio de cultivo RPMI (GIBCO) y dimetilsulfoxido (DMSO) (SIGMA); y se almacenó a 8 °C, las concentraciones de trabajo se realizaron el día de tratamiento.

### **3.2 Cultivo celular.**

Se utilizó líneas tumorales de: astrocitoma cerebral (D-384) como se indica en la Figura 5, adenocarcinoma prostático grado IV (PC-3), adenocarcinoma mamario (MCF-7), carcinoma de colon humano (RKO) y carcinoma de pulmón (A-549) las cuales fueron cultivadas en medio de cultivo RPMI (GIBCO) y células inmortalizadas de ovario de hámster chino (CHO-K1) en medio HAM-F12 (GIBCO), estos medios suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-glutamina (2mM) (GIBCO), y 1% de Antibiótico – Antimicótico (100U/ml de Penicilina G, 100µg/ml de Estreptomina y 25 µg/ml de Amphotericina B) (GIBCO). Los cultivos fueron mantenidos a 37 °C en atmosfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>, el tiempo de replicación de las líneas PC-3, MCF-7, RKO y A-549 es de 24 horas y de las CHO y D-384 es de 16 horas.



**Figura 5.** Células de astrocitoma cerebral (D-384). Cultivo de células mantenidas a 37 °C en atmosfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Visualizadas en el microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). Aumento 40x.  
**Fuente:** Autor

### 3.3 Aislamiento de linfocitos.

Se utilizó sangre total heparinizada de tres hombres jóvenes sanos (22-25 años). Utilizando medio para separación de linfocitos (LONZA), se separó por densidad los componentes de la sangre, diferenciando una banda blanca entre el suero y la banda de glóbulos rojos la cual se recogió y se le realizó lavados con buffer fosfato salino (PBS).

Luego en un tubo de 15ml se agregó: 500µl de la suspensión obtenida de aislamiento, 3500µl medio de cultivo RPMI (GIBCO) suplementado con 700µl de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 150µl de L-glutamina (2mM) (GIBCO), 50µl de Antibiótico – Antimicótico (100U/ml de Penicilina G, 100µg/ml de Estreptomina y 25 µg/ml de Amphotericina B) (GIBCO) y 100µl de fitohematoglutinina (PHA) (GIBCO). Se incubó por 48 horas a 37 °C al 5% de CO<sub>2</sub> con una inclinación de 45° y con la tapa entre abierta.

### 3.4 Siembra celular.

Se partió de un cultivo celular con una confluencia del 80%, se sembró  $2 \times 10^3$  células (tiempo de duplicación cada 24 horas) y  $1,5 \times 10^2$  células (tiempo de duplicación cada 16 horas),  $5 \times 10^3$  linfocitos en cajas de 96 pocillos con un volumen final de 100 µl para el ensayo MTS y la determinación de la IC<sub>50</sub>;  $1 \times 10^5$  células de la línea más sensible en caja de 6 pocillos con un volumen final de 3000 µl para la determinación del tipo de muerte celular; en medio de cultivo RPMI (GIBCO), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-glutamina (2mM) GIBCO), y 1% de Antibiótico – Antimicótico (100U/ml de Penicilina G, 100

µg/ml de Estreptomycin y 25 µg/ml de Amphotericin B) (GIBCO), a condiciones de 37 °C en atmosfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas (Ver Anexo 2: A2.1 y A2.2.1).

### **3.5 Ensayo de proliferación celular (MTS).**

Se trató a las líneas tumorales y células normales con las 9 horchatas (50µg/ml) durante 48 horas. Se utilizó como control negativo: dimetilsulfoxido (DMSO) al 0.5% (v/v), y como control positivo: doxorrubicina al 0.5 µM. Pasado el tiempo de tratamiento se añadió 20µl de MTS (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega) sin eliminar el medio y se incubó las células por 2 horas en oscuridad. La absorbancia se midió a 492nm frente a una referencia de longitud de onda de 650nm. La fracción de la inhibición se calculó basándose en la siguiente fórmula:

Viabilidad (%) = absorbancia de células tratadas / absorbancia de células de control x 100% (Ver Anexo 2, A2.1) (Promega, 2012).

### **3.6 Determinación de concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>).**

En la línea celular que se observó un porcentaje de inhibición mayor al 30% se aplicó dosis de 15, 45, 60, 75 y 100 µg/ml de cada horchata siguiendo el procedimiento por ensayo de proliferación celular (MTS) obteniendo porcentajes de viabilidad y mediante una regresión no lineal se estableció la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) (Ver Anexo 2, A2.1).

### **3.7 Determinación del tipo de muerte celular (Evaluación de la distribución de fosfatidilserina).**

Al cultivo celular se le aplicó la IC<sub>50</sub> de las horchatas efectivas, y se mantuvo a condiciones de 37 °C en atmosfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Se utilizó como control negativo: dimetilsulfoxido (DMSO) al 0.5% (v/v), y como control positivo: doxorrubicina al 0.5 µM.

Pasado el tiempo (48 horas) se despegaron las células con tripsina (0.25%) (GIBCO) luego para inactivarla se agregó medio suplementado con SFB (10%) y esto se recogió en un tubo para centrifugar a 4 °C a 3500 rpm. Al pellet se le realizó 2 lavados con PBS no estéril, posterior se resuspendió con buffer vinculante 1x (BD Biosciences) (Conservar no más de 1 hora) y se transfirió 100µl a un tubo de 1.5 ml protegiendo de la luz, luego se añadió 5µl de Anexina V-FITC (Santa Cruz Biotechnology) + 5µl yoduro de propidio (Santa Cruz Biotechnology), y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. (Cueva, 2014)

Se realizaron placas para leer en el microscopio de fluorescencia. Se contaron 200 células entre: vivas (Anexina V-/IP-), en apoptosis temprana (Anexina V+/IP-), en apoptosis tardía (Anexina +/IP+) y necróticas (Anexina V-/IP+).

### **3.8 Extracción y cuantificación de proteínas.**

Se partió de un cultivo celular con una confluencia del 80%, se sembró  $9 \times 10^5$  células en cajas de  $75 \text{ cm}^2$  por duplicado, en medio de cultivo RPMI (GIBCO), suplementado con 10% e Suero Fetal Bovino (SFB) (GIBCO), 1% de L-glutamina (2mM) GIBCO), y 1% de Antibiótico – Antimicótico (100U/ml de Penicilina G 100  $\mu\text{g/ml}$  de Estreptomina y 25  $\mu\text{g/ml}$  de Amphotericina B) (GIBCO), a condiciones de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  en atmosfera húmeda al 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Se trató con las concentraciones de  $\text{IC}_{50}$  durante 48 horas. Se utilizó como control negativo: dimetilsulfoxido (DMSO) al 0.5% (v/v), y como control positivo: doxorrubicina al  $0.5 \mu\text{M}$ .

Pasado el tiempo (48 horas) se despegó las células con tripsina (0.25%) y se la inactivó con SFB, luego se centrifugó por 5 minutos a 2000 rpm, al pellet se le realizó un lavado con 1 ml de PBS no estéril y se contó las células en el hemocitómetro. Al sedimento obtenido se le adicionó Buffer Coip completo (Agua destilada, Tris/HCl 1M pH 7,6, EDTA 0.5M pH 8, NaCl 5M, Igpal 0.5%, Inhibidor de proteasa 1mM e Inhibidor de fosfatasas  $100\mu\text{M}$ ),  $106,25\mu\text{l}$  por cada  $2,5 \times 10^6$  células, se resuspendió sin formar burbujas y se deja por 30 minutos en hielo (dando golpes suaves), transcurrido el tiempo se centrifugó durante 10 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a 8000 rpm, recuperando el sobrenadante se pasó a tubos de 0.5 ml y se conservó a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

La cuantificación de las proteínas extraídas se realizó por el método de Bradford, en una caja de 96 pocillos se adicionó 5  $\mu\text{l}$  de cada muestra con 145  $\mu\text{l}$  de Reactivo de Bradford (SIGMA), se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se leyó a una longitud de onda de 620nm con 15 segundos de agitación. Mediante la comparación de una curva estándar con Albumina Sérica Bovina (ASB) a concentraciones de 1, 1.5, 2, 3 y 4 mg se interpoló los valores de concentración de las proteínas de interés (Cueva, 2014).

### **3.9 Detección de proteínas por Western blot.**

Se utilizó una concentración proteica de 50  $\mu\text{g}$ , las proteínas fueron separadas en un gel SDS-PAGE (SDS-policramide gel electrophoresis) utilizando geles separadores de 12% y 15 % dependiendo de los pesos de las proteínas de interés y un gel concentrador de 4% (Agua destilada, Tris (1.5M; pH 8.8 y 0.5M; pH 6.8), Acrilamida-Bisacrilamida, PSA (persulfato de amonio) y TEMED), a condiciones de 100 voltios, 65 miliamperios por 15 minutos luego de que las proteínas hayan salido del pocillo se disminuyó los miliamperios a 35 por el tiempo necesario para obtener la proteína.

Una vez transcurrida la electroforesis, se procedió a la transferencia de las proteínas a una membrana de Fluoruro de polivinilideno (PVDF), formando el “sándwich”. La transferencia se

la llevó a cabo en un sistema Mini-Trans Blot Cell System (Bio-Rad) a condiciones de 100 voltios, 350 miliamperios durante 1 hora y 30 minutos a 4 °C.

Luego se procedió al bloqueo la membrana con TBS-Tween 1X al 5% de leche semidescremada (Svelty; NESTLÉ, Blotto, non-fat dry milk; Santa Cruz Biotechnology) durante una hora, se elimina la leche y se realizó lavados con TBS-Tween 1X, seguido se incubó con el anticuerpo primario (Bcl-2, Bax, p-Ser46-TP53, p-73, p-Tyr99-TP73, p21,  $\gamma$ -H2A.X, pSer-139- $\gamma$ H2A.X,  $\beta$ - tubulina) (Santa Cruz Biotechnology) (Ver Anexo 3) por toda la noche a 4 C° protegido de la luz. Después se realizó 3 lavados con TBS-Tween 1X por 5 minutos y 2 con TBS 1X por 10 minutos, seguido se incubó con el respectivo anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology; EMD Millipore) (Ver Anexo 3) por 2 horas protegido de la luz. Transcurrido el tiempo se realizó 3 lavados con TBS-Tween 1X por 5 minutos y 2 con TBS 1X por 10 minutos. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando una kit de quimioluminiscencia (WBLUROSOO/Luminata Crescendo Western HRP substrate). Las bandas fueron capturadas en una película de rayos X (Jaramillo, 2016).

### **3.10 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron analizados con ANNOVA post-test de Dunnett y Bonferroni para analizar la diferencia significativa entre el control y los grupos expuestos a tratamiento; y entre tratamientos, utilizando GraphPad Prisma 5.0. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

Todos los ensayos fueron realizados por duplicado en tres repeticiones independientes.

## **CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



#### 4.1 Ensayo de proliferación celular (MTS).

Se utilizó 5 líneas tumorales: carcinoma de colon humano (RKO), carcinoma de pulmón (A-549), adenocarcinoma mamario (MCF-7), adenocarcinoma prostático grado IV (PC-3) y astrocitoma cerebral (D-384), células normales inmortalizadas de ovario de hámster chino (CHO K-1) y linfocitos humanos. En la Tabla 1 se observan los porcentajes de inhibición en los distintos tipos de células utilizadas. En la línea celular A-549 no existe una diferencia significativa en el porcentaje de inhibición con respecto al control, en las RKO la **H7** presentó una inhibición del  $4.1 \pm 2.2$  ( $p < 0.01$ ), en las MCF-7 la **H2** y **H8** presentaron un porcentaje de inhibición del  $7.1 \pm 1.3$  y  $6.9 \pm 0.08$  respectivamente ( $*: p < 0.01$ ), en las PC-3 la **H2** presentó una inhibición del  $26.9 \pm 6.6$  % ( $p < 0.001$ ), en las D-384 se observó una inhibición de: **H1** ( $36.7 \pm 4.0$ ), **H2** ( $60.8 \pm 4.3$ ), **H7** ( $30.0 \pm 0.7$ ), **H8** ( $32.6 \pm 5.0$ ) y **H9** ( $60.7 \pm 0.04$ ) presentándose en todos los casos una diferencia significativa ( $***: p < 0.0001$ ).

**Tabla 1.** Efecto citotóxico de las distintas horchatas en células de cáncer humano, CHO K-1 y sobre la proliferación de linfocitos humanos normales.

Horchata (50 µg/ml)	Porcentajes de inhibición ± (SEM)					Células inmorta- lizadas (CHO K-1)	Células normales (Linfocitos)
	Líneas tumorales						
	Pulmón (A-549)	Astrocitoma (D-384)	Mama (MCF-7)	Próstata (PC-3)	Colon (RKO)		
<b>H1</b>	$1.7 \pm 1.2$	$36.7 \pm 4.0^{***}$	$5.1 \pm 1.0$	$14.7 \pm 5.4$	$2.8 \pm 0.7$	S.A.	S.A.
<b>H2</b>	$1.9 \pm 2.1$	$60.8 \pm 4.3^{***}$	$7.1 \pm 1.3^{(*)}$	$26.9 \pm 6.6^{***}$	$3.9 \pm 2.12$	S.A.	S.A.
<b>H3</b>	$1.6 \pm 0.5$	$3.3 \pm 1.6$	$0.3 \pm 1.7$	S.A.	$0.4 \pm 1.3$	S.A.	S.A.
<b>H4</b>	S.A.	$2.0 \pm 1.7$	$2.7 \pm 1.8$	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.
<b>H5</b>	S.A.	$2.5 \pm 1.7$	$4.6 \pm 1.7$	S.A.	S.A.	S.A.	S.A.
<b>H6</b>	$2.4 \pm 4.6$	S.A.	$0.2 \pm 1.2$	S.A.	S.A.	$3.0 \pm 0.3$	S.A.
<b>H7</b>	S.A.	$30.0 \pm 0.7^{***}$	S.A.	S.A.	$4.1 \pm 2.2^{(*)}$	S.A.	S.A.
<b>H8</b>	$5.1 \pm 12$	$32.6 \pm 5.0^{***}$	$6.9 \pm 0.08^{(*)}$	S.A.	$0.5 \pm 1.5$	S.A.	S.A.
<b>H9</b>	$4.4 \pm 4.7$	$60.7 \pm 0.04^{***}$	$0.7 \pm 0.2$	$2.2 \pm 9.6$	S.A.	S.A.	S.A.

**Fuente:** Autor.

S.A. Sin actividad. Cada dato representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se utilizó la prueba de Dunnet que indica que existe una diferencia significativa entre el control negativo y los tratamientos con las 9 horchatas a 50 µg/ml ( $***: p < 0.0001$ ,  $***: p < 0.001$ ,  $*: p < 0.01$ ).

En células inmortalizadas (CHO-K1) no se observa un efecto de inhibición y en los linfocitos de los tres donantes jóvenes y sanos tampoco se observa actividad, por lo que se puede decir que la horchata no produce un efecto citotóxico a dosis de 50µg/ml en células normales.

#### 4.2 Determinación de concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>).

Se utilizó las horchatas que presentaron un porcentaje de inhibición mayor al 30% en la línea D-384, evaluando a distintas concentraciones (15, 45, 60, 75 y 100 µg/ml), obteniendo porcentajes de viabilidad y mediante una regresión no lineal se estableció la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) las cuales se observan en la Tabla 2. El rango de IC<sub>50</sub> de las horchatas efectivas fue de 41 a 122 µg/ml, donde la menos potente fue la **H8** con 122.7 ± 4.3 µg/ml y la más potente la **H9** con 41.5 ± 6.2 µg/ml.

**Tabla 2.** IC<sub>50</sub> de las Horchatas en células D384

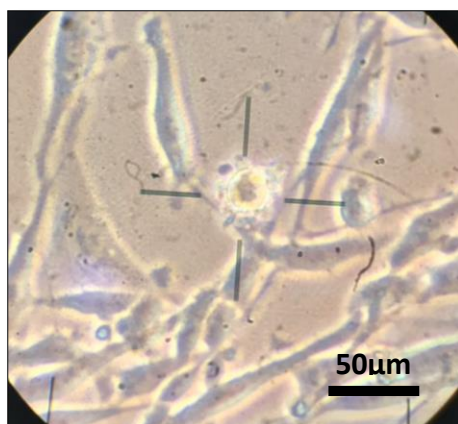
Sustancias en ensayo	IC <sub>50</sub> ± SEM
	µg/ml
	Astrocitoma cerebral (D-384)
<b>H1</b>	74.2 ± 0.7
<b>H2</b>	98.7 ± 70.4
<b>H7</b>	71.6 ± 1.8
<b>H8</b>	122.7 ± 4.3
<b>H9</b>	41.5 ± 6.2
<b>Doxorrubicina</b>	0.1 ± 0.2

Fuente: Autor.

Cada dato representa la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

#### 4.3 Determinación del tipo de muerte celular (Evaluación de la distribución de fosfadilserina).

Una vez que se estableció la IC<sub>50</sub>, se continuó con el estudio del tipo de muerte celular con las horchatas de menor IC<sub>50</sub>, es decir, la **H1**, **H7** y **H9** (74, 71 y 41 µg/ml respectivamente). En la Figura 6. se evidencian cuerpos apoptóticos al alrededor de células D-384 tratadas con **H9**.

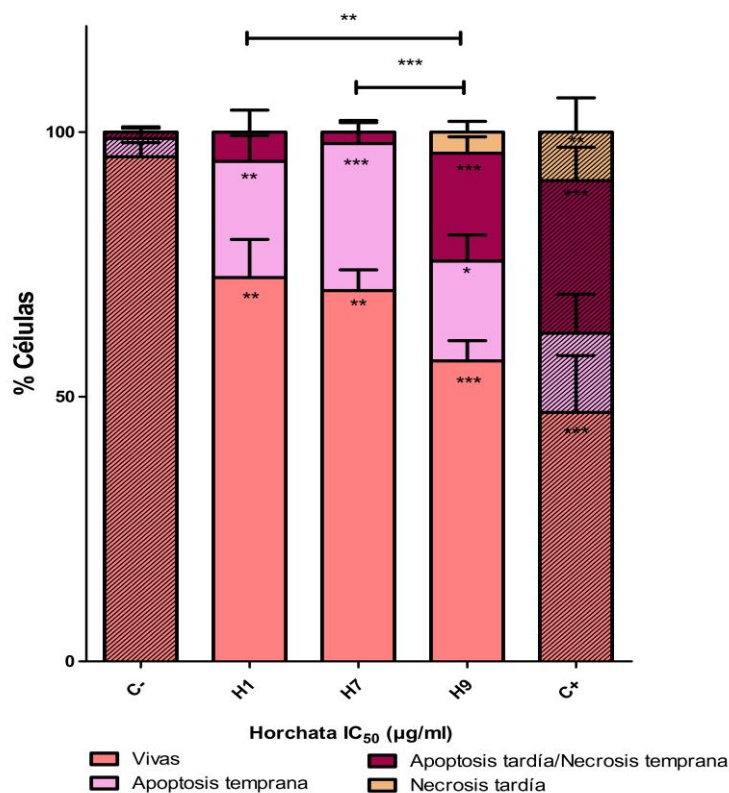


**Figura 6. Célula D-384 en apoptosis.** Expuestas a la dosis de IC<sub>50</sub> (41 µg/ml) de la **H9**. Visualizadas en el microscopio invertido con contraste de fases (Nikon). Aumento 40x.

Fuente: Autor.

En la Gráfica 1 se observan los porcentajes de células: vivas, en apoptosis temprana, en apoptosis tardía y en necrosis tratadas con: DMSO (0.5%) para el control negativo, doxurrubicina (0.5µg/ml) para el control positivo y las IC<sub>50</sub> de las **H1**, **H7** y **H9**.

El porcentaje de células vivas en el control negativo fue del 95.3 ± 1.3%, mientras que en el control positivo fue del 45.0 ± 5.6 % y en las **H1**, **H7** y **H9** (72.5 ± 3.5, 69.1 ± 1.9 y 56.9 ± 2.1 % respectivamente) observando una disminución significativa (\*\*\*:p<0.0001 y \*\*: p<0.001).



**Gráfica 1. Porcentaje de muerte.** Células D-384 expuestas a las dosis de IC<sub>50</sub> de la **H1**, **H7** y **H9** (74, 71 y 41 µg/ml) y sus controles: negativo (DMSO 0.5%) y positivo (Doxurrubicina 0.5 µg/ml) durante 48 horas. Los datos se presentan la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se analizó mediante ANOVA post – test Dunnet (\*\*\*:p<0.0001, \*\*: p<0.001 \*:p<0.01) y test Bonferroni (Apoptosis tardía: \*\*\*:p<0.0001, \*\*: p<0.001 \*:p<0.01).

**Fuente:** Autor.

Por otro lado ya refiriéndose al proceso de muerte, en el control negativo se evidenció células en apoptosis: 3.4 ± 0.9 % temprana y un 1.2 ± 0.5 % tardía. En el control positivo se observó células en apoptosis temprana 15.3 ± 4.2 %, en apoptosis tardía un 29.7 ± 3.47 % y un 9.8 ± 3.6 % de células necróticas.

En cuanto a las células expuestas a las horchatas se evidenció que la **H7** presentaba un 28.0 ± 1,9 % de células en apoptosis temprana y un 2.2 ± 1.2 en apoptosis tardía. Así mismo, la **H1** causa un 21.9 ± 2.4% de células en apoptosis temprana y un 5.5 ± 2.08 % en apoptosis

tardía. Mientras que la **H9** presentó un porcentaje de células en apoptosis temprana del  $20.0 \pm 2.4 \%$ , en apoptosis tardía un  $19.3 \pm 1.1\%$  y un  $3.6 \pm 1.09 \%$  de células necróticas.

Existió una diferencia significativa (\*\*\*: $p < 0.0001$  y \*\*:  $p < 0.001$ ) entre las 3 horchatas en cuanto al estadio tardío de la apoptosis después de 48 horas de tratamiento, dado que la **H7** a este tiempo está iniciando el proceso de muerte, mientras que la **H1** ya ha iniciado el proceso observándose un porcentaje de células muertas, por el contrario la **H9** tiene el efecto más acelerado, ya que existe un mayor porcentaje de células en apoptosis tardía e incluso debrís celular.

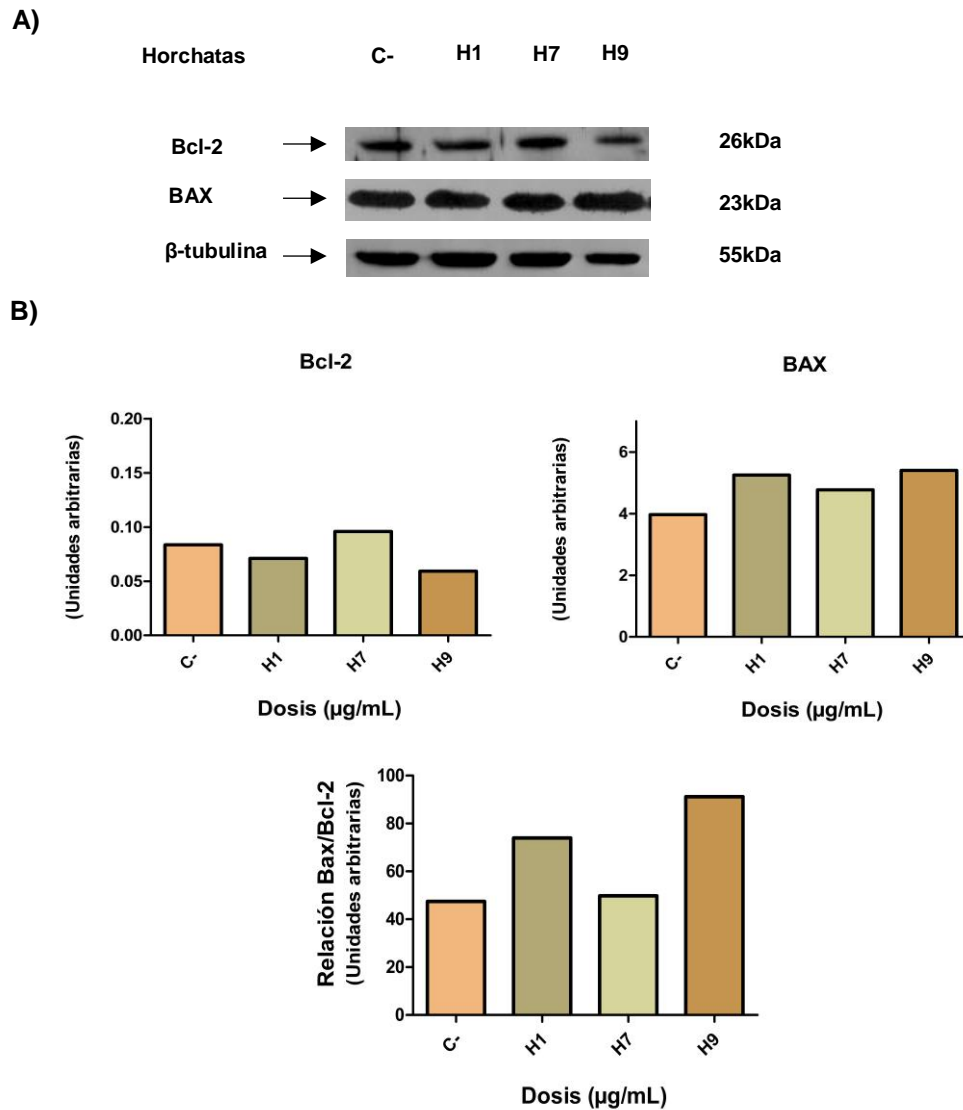
Comparando el efecto del control negativo con las horchatas se observa una diferencia significativa (\*\*\*: $p < 0.0001$  y \*\*:  $p < 0.001$ ) en los porcentajes de apoptosis temprana, tardía y células necróticas.

#### **4.4 Detección de proteínas mediante Western blot**

Realizada la extracción y cuantificación de las proteínas obtenidas de las células D-384 al ser expuestas a las  $IC_{50}$  de las **H1**, **H7** y **H9** (74, 71 y 41  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente) durante 48 horas, se procedió al análisis de la proteínas mediante Western blot.

Cuando la células reciben un estímulo de muerte (daño al ADN o señales de estrés celular) interviene p53 el "ángel" guardián del genoma humano, que se fosforila en Serina 46 y toma dos caminos: 1. Activar a proteínas que inhiben a CDK (quinasas dependientes de ciclina) como p21/Waf1/Cip1, que detiene el ciclo celular en la fase G1 para inhibir el crecimiento celular, dando tiempo para que la maquinaria de reparación haga su trabajo. 2. Activar a proteínas pro-apoptóticas como Bax, pues si el daño es irreparable o demasiado tarde, las células entran inevitablemente a la muerte por apoptosis (Guamán, 2012). La fosforilación de p73 en tirosina 99 también permite la translocación de Bax en la membrana mitocondrial promoviendo la apoptosis (Melino et al., 2004; Smeenk, Van Heeringen, Koepfel, Gilbert, & Janssen-Megens, 2011).

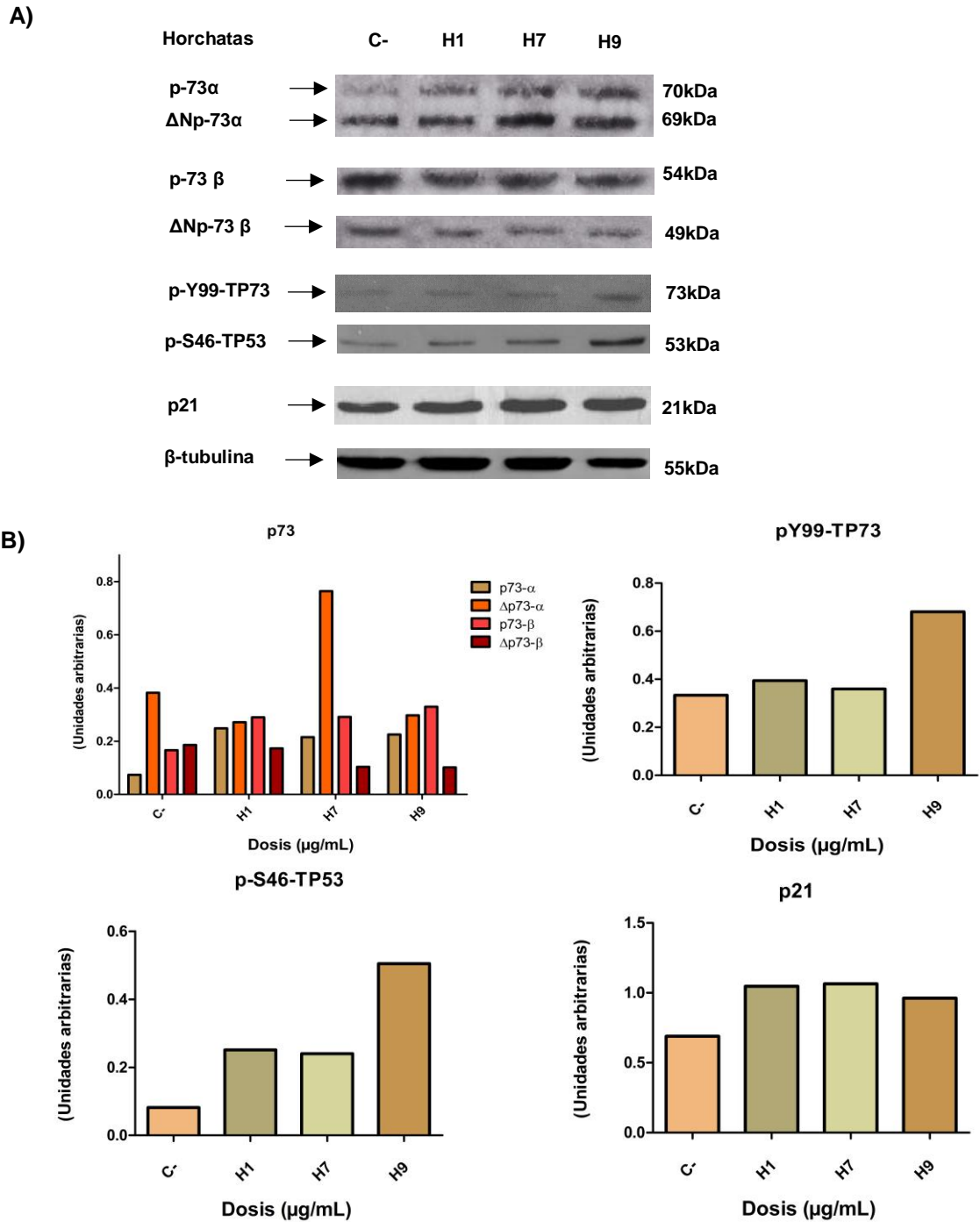
Por un lado observando en la Gráfica 2A y 2B las horchatas son capaces de modular las proteínas relacionadas con la muerte por apoptosis. Evaluando las proteínas Bax (pro-apoptótico) y Bcl-2 (anti-apoptótico) se observó que tanto en la **H1** como en la **H9**, Bax se encuentra aumentada y Bcl-2 disminuida con respecto al control negativo, es decir, se estaría promoviendo la liberación del citocromo C al exterior de la mitocondria para la posible formación del apoptosoma dado que el complejo Bax/Bcl-2 se encuentra en desequilibrio. Mientras que en la **H7** tanto Bax como Bcl-2 se encuentran aumentados.



**Gráfica 2. Proteínas apoptóticas.** Células D-384 expuestas a 74, 71 y 41 µg/ml de **H1**, **H7** y **H9** respectivamente durante 48 h. A) Los lisados de proteína total se separaron mediante SDS-PAGE al 12-15%, seguido por análisis de Western Blot con los anticuerpos indicados contra Bcl-2, Bax y β tubulina. La β-tubulina se usó como controles de carga para los extractos celulares totales. B) Cuantificación proteica mediante el escáner y software C-Digit Blot Scanner.

**Fuente:** Autor

Así también en la Gráfica 3A y 3B se indica la expresión de la familia de p53 y p21, donde se observa el aumento de la expresión de p-73α y p-73 β en todas las horchatas analizadas (**H1**, **H7** y **H9**) y la disminución de ΔNp-73, con excepción en la **H7**; se evidencia que las células serían dependientes de la fosforilación de p53 al aplicar las **H1** y **H7** y de p53/p73 al tratarlas con la mezcla **H9** como reguladores de muerte celular; y la activación de p21 para la inhibición de las CDK y provocar una posible detención del ciclo celular.

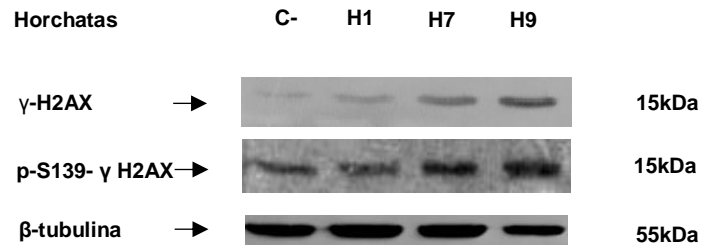


**Gráfica 3. Proteínas de la familia de p53 y p21.** Células D-384 expuestas a 74, 71 y 41  $\mu$ g/ml de **H1**, **H7** y **H9** respectivamente durante 48 h. A) Los lisados de proteína total se separaron mediante SDS-PAGE al 12-15%, seguido por análisis de Western Blot con los anticuerpos indicados contra p73, p-Y99-TP73, p-S46-TP53, p21 y  $\beta$  tubulina. La  $\beta$ -tubulina se usó como controles de carga para los extractos celulares totales. B) Cuantificación proteica mediante el escáner y software C-Digit Blot Scanner.

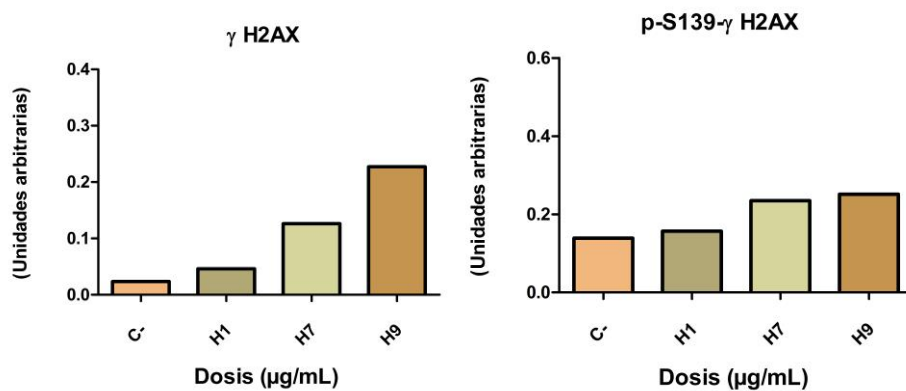
**Fuente:** Autor

El arresto del ciclo celular podría darse por un posible daño genotóxico (roturas en el ADN) causado por **H1**, **H7** y **H9** en las células D-384, para dar tiempo a que el daño sea reparado. En la Gráfica 4A y 4B se observa las proteínas nucleares como las histonas ( $\gamma$ -H2AX y su forma fosforilada) que están aumentadas con respecto al control negativo.

A)



B)



**Gráfica 4. Proteínas nucleares.** Células D-384 expuestas a 74, 71 y 41  $\mu\text{g/ml}$  de H1, H7 y H9 respectivamente durante 48 h. A) Los lisados de proteína totales se separaron mediante SDS-PAGE al 15%, seguido por análisis de Western Blot con los anticuerpos indicados contra  $\gamma$ H2AX, p-S139-  $\gamma$ H2AX y  $\beta$  tubulina. La  $\beta$ -tubulina se usó como controles de carga para los extractos celulares totales. B) Cuantificación proteica mediante el escáner y software C-Digit Blot Scanner.

**Fuente:** Autor

## DISCUSIÓN

El presente estudio describe la capacidad de la horchata para causar inhibición del crecimiento e inducción de la apoptosis principalmente en la línea de astrocitoma cerebral *in vitro* a través de la activación de proteínas implicadas en la regulación de estas rutas. La horchata es una mezcla de hasta 71 plantas medicinales, las cuales varían de 16 a 32 especies según su disponibilidad geográfica y temporal (Rios et al., 2017) cada una con propiedades antiinflamatorias, antioxidantes entre otras, que se consume comúnmente como infusión para curar varias dolencias. Las plantas medicinales podrían ser la fuente más representativa en la obtención de agentes quimioterapéuticos, debido a sus propiedades y su contribución al descubrimiento de nuevas moléculas citotóxicas con múltiples mecanismos de acción (Lorraine & Mendoza-Espinoza, 2010; Munoz & Cuca, 2015).

El ensayo de proliferación celular (MTS) empleado en el screening primario para conocer si un extracto o fármaco puede inhibir el crecimiento de células tumorales (Rivas-Morales, Oranday-Cárdenas, & Verde-Star, 2016) indicó una inhibición mayor al 30% en la línea de astrocitoma cerebral (D-384) en 5 horchatas (**H1**, **H2**, **H7**, **H8** y **H9**) de las 9 evaluadas. El efecto citotóxico en la línea de astrocitoma cerebral probablemente estaría relacionado con su uso medicinal ya que una de las propiedades de la horchata es de ser tónico cerebral (Tinitana, 2014). Las plantas que componen a las horchatas efectivas (**H1**, **H7** y **H9**) que se ha descrito que presentan esta propiedad y además son neuroprotectoras: *Amaranthus hybridus* L., *Melissa officinalis* L., *Cymbopogon citratus* Stapf y *Aloysia triphylla* (L'Her) Briton (Leonita, Utami, & Wibisono, 2015; Lopez et al., 2009; Zamorano-Ponce, Fernández, Vargas, Rivera, & Carballo, 2004) como se observa en la Tabla 3 y Anexo 1.

Estudios indican que otros brebajes utilizados por distintas poblaciones son potentes antitumorales e inhiben la formación de metástasis (Pesee, Kirpon, Puapairoj, Kirpon, & Prathnadi, 2008), así mismo los tónicos cerebrales se cree que presentan un potencial anticancerígeno por la presencia de antioxidantes principalmente, en células normales se ha observado que poseen capacidad protectora frente al daño neuronal mediado por estrés oxidativo. (Arvelo et al., 2012; Pesee et al., 2008). En el presente estudio se expuso a células inmortalizadas de ovario de hámster chino (CHO-K1) y a linfocitos a dosis de 50 µg/ml observando que no existía un efecto citotóxico, así también estudios anteriores de extractos de horchata aplicados a mayores concentraciones con agentes inductores de daño oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en CHO-K1 presentaron actividad antioxidante y antigenotóxica (Palacio-Arpi, 2016), lo cual estaría de acuerdo con Ramos (2008), la presencia de antioxidantes en ciertas plantas



medicinales provee una acción protectora en células normales y efectos citotóxicos en células neoplásicas.

**Tabla 3. Especies presentes en las horchatas efectivas (H1, H7 y H9), su concentración en porcentaje (%) y efectos reportados en modelos biológicos.**

Especies presentes				Modelo biológico	Efecto reportado	Referencias
Horchatas	H1 (%)	H7 (%)	H9 (%)			
<i>Iresine herbstii</i> Hook.	13.2	11.3	12.2	Cáncer cervical (Hela) y ovárico (SKOV3)	Citotóxico Citostático Apoptótico	(Cai, Sun, & Corke, 2003; Chaudhuri & Sevanan, 2012)
<i>Pelargonium graveolens</i> L'Herit	15.7	7.1	7.2	Células de glioblastoma multiforme (U87 y T98G), adenocarcinoma prostático (PC-3), cáncer de mama (MCF-7).	Citotóxico Citostático Apoptótico	(Dickerson, L., Jain, A., Crowell, P. L., Lai, J. C., & Bhushan, 2012; Duncan, Lau, El-sohemy, & Archer, 2004; Sienkiewicz, Głowaka, Kowalczyk, Józwiak-Bębenista, & Monika Łysakowska, 2014)
<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf	5.1	7.3	1.2	Células de glioblastoma multiforme (A172, U87, DBTRG-05, U-251, U373MG, A172, U251), cáncer de mama (MCF-7), células leucémicas (HL-60 y NB4), células de carcinoma colorectal, (HCT-116) carcinoma de ovario (SKOV3) cáncer de mama (MCF-7), Células de carcinoma pancreático (BxPC-3) células de neuroblastoma (SH-SY5Y),	Citotóxico Citostático Apoptótico Neuroprotector	(Dudai, Weinstein, Krup, Rabinski, & Ofir, 2005; Halabi & Sheikh, 2014; Negrelle & Gomes, 2007; Puatanachokchai et al., 2002)
<i>Rosa canina</i>	1.1	0.5	-	Cáncer cervical (HeLa), cáncer de mama (MCF-7), adenocarcinoma de colon (HT-29), Células de glioblastoma (A-172, U-251y U-1242)	Citotóxico Citostático	(Cagle et al., 2012; Tumbas et al., 2012)
<i>Melissa officinalis</i> L.	4.5	-	-	Células de glioblastoma multiforme, cáncer ovárico (SKOV3), adenocarcinoma prostático (PC-3), cáncer de mama (MCF-7), adenocarcinoma de colon (HT-29), Células de feocromocitoma de rata (PC12)	Citotóxico Citostático Apoptótico Neuroprotector	(Čanadanović-Brunet et al., 2008; de Sousa et al., 2004; Encalada et al., 2011; Jahanban-Esfahlan, Modaeinama, Abasi, Abbasi, & Jahanban-Esfahlan, 2015; Lopez et al., 2009; Queiroz et al.,

						2014; Rashidi, Malekirad, Abdollahi, & Habibollahi, 2014; Saraydin et al., 2012; Weidner et al., 2015)
<b><i>Amaranthus hybridus</i> L.</b>	-	-	19.7	Ratas blancas de cepa <i>Wistar</i>	Neuroprotector	(Leonita et al., 2015)
<b><i>Borago officinalis</i></b>	-	-	41.2	Células de astrocitoma y glioblastoma (MOG-G-CCM, U373, U87)	Apoptótico Citotóxico Citostático	(Das, 2007)
<b><i>Mentha spicata</i> L.</b>	-	-	1.5	Células de glioblastoma multiforme (U87), adenocarcinoma de pulmón (A-549), cáncer de colon (HCT-116), adenocarcinoma prostático (PC-3), cáncer de mama (MCF-7).	Apoptótico Citotóxico Citostático	(Berdowska et al., 2013; Hajighasemi, Hashemi, & Khoshzaban, 2011; Sharma, Hussain, & Gupta, 2014)
<b><i>Aloysia Triphylla</i> (L'Her) Briton</b>	-	-	2.3	Células de cerebro	Neuroprotector	(Zamorano-Ponce et al., 2004)

/: concentración en porcentaje; **H**: Horchatas; - : ausencia de especie.

Fuente: Autor

Por otro lado con los resultados observados se puede establecer que las horchatas más potentes (**H1**, **H7** y **H9**) inducen a apoptosis, de acuerdo con los dos biomarcadores apoptóticos utilizados en este estudio: la externalización de la fosfatidilserina y la detección de proteínas implicadas en la regulación del tipo de muerte celular (Moreno et al., 2000).

En la Tabla 3. se indican las plantas presentes (*Iresine herbstii*, *Cymbopogon citratus* Stapf, *Pelargonium graveolens* L'Herit, *Rosa canina.*, *Melissa officinalis* L., *Amaranthus hybridus* L., *Borago officinalis*, *Aloysia triphylla* (L'Her.) Britton, *Mentha spicata* L.) en las horchatas efectivas (**H1**, **H7** y **H9**), su concentración en porcentaje de cada planta, y los efectos reportados: citotóxico, citostático y apoptótico en distintas líneas tumorales de cerebro (U-87, T98G, A-172, DBTRG-05, U-251, SH-SY5Y, U-373, U-251, U-1242, MOG-G-CCM y U-373), cáncer de mama (MCF-7) (Chaouki, Leger, & Liagre, 2009; Zu et al., 2010), células de leucemia (U937 y HL60) (Dudai et al., 2005) entre otras; y en algunos casos neuroprotector en células normales de cerebro. Cabe recalcar que el análisis de las plantas responsables de los efectos producidos en las células es complicado de establecer por la complejidad de la mezcla de plantas en la horchata, por lo que varios de los metabolitos secundarios de éstas podrían estar influyendo en los efectos observados, tal como se observa en la Tabla 4, compuestos como betalainas, geraniol, citral, curcumina, resveratrol, quercetina y ácido linoleico presentes en las horchatas potentes (**H1**, **H7** y **H9**) podrían estar involucrados en la inducción de apoptosis (Bax, Bcl-2 y caspasa-3) y arresto celular (p21), vías reguladas por p53 y en algunos casos también por p73; y ciertos compuestos del daño genotóxico causado.

Por lo que la presencia de ciertas plantas o en sí la mezcla de las plantas medicinales en la horchata podría estar disminuyendo o potenciando el efecto observado, pues su efecto dependería del microambiente en el que se encuentren los metabolitos secundarios, pudiendo interactuar entre sí, produciéndose efectos sinérgicos o inhibitorios dependientes de la concentración y la estructura (Cai et al., 2003; Djeridane et al., 2006; Echavarría et al., 2016).

**Tabla 4. Compuestos que se encuentran en las especies presentes en las H1, H7 y H9 que producen efectos apoptótico y genotóxico.**

Compuesto	Especie	Efecto Apoptótico (proteínas involucradas)	Efecto genotóxico (SI/NO)	Referencias
<b>Betalainas</b>	<i>Iresine Herbstii</i> Hook. <i>Amaranthus hybridus</i> L.	p21 ↑ Bax ↑ Bcl-2 ↓	NO	(Gandía-herrero, Escribano, & García-carmona, 2014)
<b>Geraniol</b>	<i>Pelargonium graveolens</i> L'Herit. <i>Aloysia triphylla</i> (L'Her.) Britton. <i>Rosa canina</i> .	Bax ↑ Bcl-2 ↓ p21 ↑ Caspasa-3 ↑	SI	(Dickerson, L., Jain, A., Crowell, P. L., Lai, J. C., & Bhushan, 2012; Duncan et al., 2004; Kim et al., 2011; Sienkiewicz et al., 2014)
<b>Citral</b>	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf. <i>Aloysia triphylla</i> (L'Her.) Britton. <i>Melissa officinalis</i> L.	Bax ↑ Bcl-2 ↓ p21 ↑ p53 ↑ Caspasa-3 ↑	SI	(Chaouki et al., 2009; Dudai et al., 2005; Xia, Liang, Song, & Nb, 2013)
<b>Curcumina</b>	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf. <i>Amaranthus hybridus</i> L. <i>Mentha spicata</i> L. <i>Melissa officinalis</i> L.	Bax ↑ Bcl-2 ↓ p53 ↑ p73 ↑ Caspasa-3 ↑	SI	(Kikuchi, Kuribayashi, Kiwaki, & Nakayama, 2010; Patel, Thakkar, & Patel, 2015; Woo et al., 2003)
<b>Resveratrol</b>	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf. <i>Mentha spicata</i> L. <i>Melissa officinalis</i> L.	p21 ↑ p53 ↑ p73 ↑ Caspasa-3 ↑	NO	(Ahmad, Adhami, Afaq, Feyes, & Mukhtar, 2001; Y. Chen, Tseng, Lai, & Chen, 2004; Gagliano et al., 2010; Parada, 2012)
<b>Quercetina</b>	<i>Rosa canina</i> . <i>Fuchsia Hypoleuca</i> Hort.	p21 ↑ p53 ↑	NO	(Jakubowicz-gil, Langner, Wertel, Piersiak, & Rzeski, 2010; Langner, 2013)
<b>Ácido linoleico</b>	<i>Borago officinalis</i>	p21 ↑ p53 ↑ Caspasa-3 ↑	NO	(Das, 2007)

↑: Aumento; ↓: Disminución

Fuente: Autor

Por ello se realizó un análisis comparativo entre horchatas, donde las plantas presentes en **H1, H7, H8 y H9** son *Iresine herbstii* Hook., *Pelargonium graveolens* L'Herit. y *Cymbopogon citratus* Stapf., mientras que la **H2** no presentó *Cymbopogon citratus* Stapf. La ausencia de

esta planta en la **H2** podría ser la responsable de su bajo potencial, ya que ésta contiene algunos compuestos con potencial apoptótico (Tabla 3); mientras que la mezcla **H8** indicó mayores porcentajes de las plantas mencionadas anteriormente, comparada con las horchatas efectivas (**H1**, **H7** y **H9**), siendo esta la menos potente según su IC<sub>50</sub> (122 µg/ml), por tanto la presencia de estas plantas influiría en el efecto pero no en forma dependiente de la concentración, deduciendo que las plantas que difieren entre horchatas (**H1**, **H7** y **H9**) podrían estar potenciando o dando el efecto característico en cada caso, es así que, la especie *Rosa canina* que está únicamente en **H1** y **H7**, estaría implicada en la disminución de las células tanto en viabilidad como en número de células de glioblastoma (Cagle et al., 2012). Por otro lado, la exposición a la **H7** indujo una sobreexpresión de Bcl-2, observando la relación Bax/Bcl-2 igual que el control negativo, así como un mayor número de células en apoptosis temprana, lo cual puede entenderse como una resistencia al tratamiento (Jakubowicz-gil et al., 2010; Romero, 2014), similar a lo observado por Jakubowicz (2010) al aplicar quercetina, la cual se encuentra en *Rosa canina* y *Fucsia Hypoleuca* Hort., a células de astrocitoma cerebral, vía regulada por p53; por otra parte, en la mezcla **H1** la única especie que difería de entre las demás horchatas efectivas fue *Melissa officinalis* L.; tanto el extracto como el componente mayoritario, citral, eran capaces de inducir a apoptosis en células de glioblastoma multiforme, regulada por p53, lo cual estaría incrementando su actividad (Dangkong & Limpanasithikul, 2014; Queiroz et al., 2014).

Por el contrario la **H9** poseía 4 especies diferentes con respecto a **H1** y **H7** que podrían influir en el fenotipo de muerte inducido, una de ellas es la *Borago officinalis* la cual se encontró en mayor porcentaje con respecto a las demás horchatas, esta especie presenta como compuesto mayoritario el ácido linoleico que causa apoptosis en neuroblastomas, astrocitomas y gliomas cerebrales, además que actúa de forma dependiente de la concentración (Das, 2007), el extracto de *Mentha spicata* L. también puede favorecer en el efecto de inhibición del crecimiento y apoptosis (Amaral, Fonseca, Kayne, Silva, & Andrade, 2015; Sharma et al., 2014) y finalmente los efectos neuroprotectores de *Amaranthus hybridus* L. y *Aloysia triphylla* (L'Her) Britton (Cai et al., 2003; Lasagni, Reides, Ferreira, & Llesuy, 2013; Leonita et al., 2015; Zamorano-Ponce et al., 2004) estarían influyendo en el efecto citotóxico, debido a la presencia de antioxidantes. Dado que esta horchata es la más potente según su IC<sub>50</sub> (41 µg/ml) se deduce que los compuestos presentes podrían estar actuando sinérgicamente potenciando el efecto apoptótico, y además de la regulación dependiente de la fosforilación de p53/p73, se ha visto que muchos fármacos quimioterapéuticos inducen la expresión de p53, y a su vez aumenta la apoptosis si es dependiente de p73 (C. Chen et al., 2013).

Es importante mencionar que las modificaciones postraduccionales como la fosforilación en la Serina 46/ Tirosina99 de p53/p73 respectivamente son decisivas, ya que permiten la unión con más afinidad a proteínas proapoptóticas como Bax (Smeenk et al., 2011), pues su sobreexpresión causa el aumento en la relación Bax/Bcl-2 permitiendo la liberación del citocromo C de la mitocondria para promover la apoptosis (Liou & Storz, 2014). Estos cambios en la expresión proteica están relacionados con los porcentajes de estadios tempranos y tardíos de la apoptosis, es así que en este caso la **H7** actúa de manera más lenta que **H1** y **H9**, ya que al probar todas las horchatas a la IC<sub>50</sub> y al mismo tiempo de exposición, las células tratadas con **H7** se encuentran en mayor proporción en apoptosis temprana (el fenotipo observado podría ser por una posible resistencia al tratamiento relacionado por un lado a la relación Bax/Bcl-2 y al aumento de  $\Delta p73\alpha$ , la cual inhibe la promoción de la apoptosis inducida por p73 así como por p53 (Melino et al., 2004)), mientras que las células expuestas a la **H1** y la **H9** se observan células en apoptosis tardía e incluso en la **H9** se evidencia debrís celular.

Un factor crucial implicado en la activación y promoción de la apoptosis es el aumento de ROS, se evidencio que las **H1, H2, H5, H7 y H9** inhibían la producción de ROS en células normales (CHO-K1) frente a agentes inductores (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por la presencia de antioxidantes (Palacio-Arpi, 2016), como se indicó anteriormente los antioxidantes pueden tener una capacidad protectora en células normales y citotóxica en células tumorales, observando esto cuando se aplica geraniol, citral y curcumina (Ver Tabla 4) (Berdowska et al., 2013; Cai et al., 2003; Halabi & Sheikh, 2014; Weidner et al., 2015) que actúan como pro-oxidantes y genotóxicos, estimulando la producción de ROS (Woo et al., 2003) o potencian la generación de ROS por otros agentes en algunos modelos de células tumorales (Kikuchi et al., 2010). El aumento de ROS está relacionado con el daño al ADN de tipo de rotura de doble cadena, lo que conlleva a la expresión de proteínas nucleares como H2AX y la fosforilación creciente en Ser 139 (Sahu, Batra, & Srivastava, 2009; Tyagi et al., 2005) y por consiguiente activa a mecanismos de reparación del daño (Parada, 2012; Tyagi et al., 2005) vía regulada por la fosforilación de p53, encargado de activar a un inhibidor de CDK, como p21, para detener el ciclo celular y dar tiempo para que el daño sea reparado (Guamán, 2012). El grado de daño del ADN presente en las células D-384 medido por H2AX y su forma fosforilada podría explicar la citotoxicidad observada con el tratamiento, en consecuencia la maquinaria de reparación no pudo solventar los daños y las células se vieron obligadas a entrar en el proceso de muerte celular apoptótica, como lo demuestra la creciente expresión de Bax en las **H1, H7 y H9**.

En general, los resultados respaldan la idea de que la horchata puede inhibir el crecimiento particularmente en células de astrocitoma cerebral (D-384), activando la detención del ciclo celular y la apoptosis a través de la modulación dependiente de la fosforilación de p53/p73, demostrando efectos citostáticos, citotóxicos y genotóxicos, no obstante la gran diversidad de plantas que se utilizan en la preparación de esta bebida, de forma tradicional, hace que sea complejo el estudio de los metabolitos secundarios responsables de los efectos observados, por un lado el efecto citotóxico específico para células tumorales de astrocitoma y no en otras líneas cancerígenas e incluso en células normales (Palacio-Arpi, 2016), por lo que conlleva a realizar estudios más profundos para identificar los compuestos que verdaderamente están involucrados en los efectos citostáticos, citotóxicos y genotóxicos así como las rutas moleculares relacionadas.

## CONCLUSIÓN

Particularmente en las células de astrocitoma cerebral (D-384) las mezclas de horchatas (**H1**, **H2**, **H7**, **H8** y **H9**) causaron un efecto inhibitorio mayor al 30%, este efecto probablemente estaría relacionado con su uso en la medicina tradicional ya que una de las propiedades de la horchata es de ser tónico cerebral. Por otro lado en células inmortalizadas de ovario de hámster chino (CHO-K1) y en linfocitos no se observó un efecto citotóxico a dosis de 50µg/ml. El rango de la IC<sub>50</sub> de las horchatas efectivas en D-384 fue de 41 a 122 µg/ml, donde la menos potente fue la **H8** con  $122,7 \pm 4.3$  µg/ml y la más potente la **H9** con  $41.5 \pm 6.2$  µg/ml. Las horchatas más potentes (**H1**, **H7** y **H9**) aplicadas a las IC<sub>50</sub> indujeron a las células a apoptosis mediada por p53/p73, así como también la detención del ciclo y daño genotóxico. La expresión de las proteínas están relacionadas con los porcentajes de estadios tempranos y tardíos de la apoptosis, es así que en este caso la **H7** actúa de manera más lenta que **H1** y **H9** donde las células se encontraban en mayor proporción en apoptosis temprana mientras que las células expuestas a la **H1** y la **H9** se observan células en apoptosis tardía e incluso en la **H9** se evidencia debrís celular. El análisis de los efectos producidos en las células es complicado de establecer por la complejidad de la mezcla de plantas en la horchata, por lo que algunos metabolitos secundarios de las plantas podrían estar influyendo en el efecto observado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Advansta. (2011). Analisis de proteínas Electroforesis,transferencia e inmunodetección. *Encogen*, 1–24.
- Ahmad, N., Adhami, V. M., Afaq, F., Feyes, D. K., & Mukhtar, H. (2001). Resveratrol Causes WAF-1 / p21-mediated G<sub>1</sub> -phase Arrest of Cell Cycle and Induction of Apoptosis in Human Epidermoid. *Journal of Clinical Cancer Research*, 7(May), 1466–1473.
- Alarcón, J. (2011). Plantas aromáticas y medicinales: Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. *Revista aaramayoMedidas Para La Temporada Invernal*, 1, 48.
- Amaral, R. G., Fonseca, C. S., Kayne, T., Silva, M., & Andrade, L. N. (2015). Evaluation of the cytotoxic and antitumour effects of the essential oil from *Mentha x villosa* and its main compound , rotundifolone. *Journal of Pharmacy And Pharmacology*, 67, 1100–1106. <https://doi.org/10.1111/jphp.12409>
- American Brain Tumor Association. (2012). Sobre tumores cerebrales. Manual para pacientes y cuidadores, 84. Retrieved from <http://www.abta.org/resources/spanish-language-publications/sobre-tumores-cerebrales.pdf>
- American Cancer Society. (2015a). Cancer stadistics center. Retrieved from <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#/>
- American Cancer Society. (2015b). Global Cancer Facts & Figures 3rd Edition., (800), 1–64. <https://doi.org/10.1002/ijc.27711>
- Aramayo, R., Sherman, M. B., Brownless, K., Lurz, R., Okorokov, A. L., & Orlova, E. V. (2011). Quaternary structure of the specific p53 – DNA complex reveals the mechanism of p53 mutant dominance. *Journal of Nucleic Acids Research*, 1–12. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr386>
- Arango, S. (2013). Guia de plantas medicinales de uso común en Salento, Colombia. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Arencibia, D., Rosario, L., & Curveco, D. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia , algunas consideraciones y su utilidad . *Revista de Toxicologia*, 40–52. Retrieved from [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/19003.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf)
- Arvelo, W., Sosa, S. M., Juliao, P., López, M. R., Estevéz, A., López, B., & Lindblade, K. (2012). Norovirus outbreak of probable waterborne transmission with high attack rate in a Guatemalan resort. *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan*



*American Society for Clinical Virology*, 55(1), 8–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.02.018>

Aukanaw. (2007). Plantas medicinales usadas por los Mapuches. *Journal of Folklore Tradiciones*, 37.

Ávalos, A., & Elena, G. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Revista Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145.

Bailon-Moscoso, N., Gonzalez-Arevalo, G., Velasquez-Rojas, G., Malagon, O., Zentella-Dehesa, A., Ratovitski, E. A., & Ostrosky-Wegman, P. (2015). Phytometabolite Dehydroleucodine induces cell cycle arrest, apoptosis, and DNA damage in human astrocytoma cells through p73/p53 regulation. *PLOS ONE*, 10(8), 1–18.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136527>

Bao, Q., & Shi, Y. (2007). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Journal of Cell Death and Differentiation*, 14(1), 56–65.  
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402028>

Berdowska, I., Zieliński, B., Fecka, I., Kulbacka, J., Saczko, J., & Gamian, A. (2013). Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells. *Journal of Food Chemistry*, 141(2), 1313–1321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.090>

Beresi, V., & Del Pozo, H. (1976). Quimioterapia en los tumores malignos de la infancia. *Revista Chilena de Pediatría*, 47.

Berghe, T., Vanlangenakker, N., Parthoens, E., Deckers, W., Devos, M., Festjens, N., & Guerin, C. (2009). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Journal of Cell Death and Differentiation*, 17(6), 922–930.  
<https://doi.org/10.1038/cdd.2009.184>

Bertero, D., Serra, M., Verdu, A., & Trillo, C. (2009). Plantas Andinas y sus Usos Tradicionales. *Ciencia Hoy En Linea*, 19(112), 1–8. Retrieved from <http://hdl.handle.net/2117/2373>

Bucher, N., & Britten, C. (2008). G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Journal of Cancer*, 1(December 2007), 523–528.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604208>

Cagle, P., Idassi, O., Carpenter, J., Minor, R., Goktepe, I., & Martin, P. (2012). Effect of Rosehip ( *Rosa canina* ) Extracts on Human Brain Tumor Cell Proliferation and Apoptosis. *Journal of Cancer Therapy*, 3(October), 534–545.

- Cai, Y., Sun, M., & Corke, Ha. (2003). Antioxidant Activity of Betalains from Plants of the Amaranthaceae. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2288–2294.
- Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanović, G., Mandić, A., ... Čanadanović, V. (2008). Radical Scavenging, Antibacterial, and Antiproliferative Activities of *Melissa officinalis* L. Extracts. *Journal of Medicinal Food*, 11(1), 133–143. <https://doi.org/10.1089/jmf.2007.580>
- Carrión, H. (2012). *El etnoecosistema en la producción de plantas medicinales en la comunidad "El Carmelo."* Universidad Internacional de Andalucía. Retrieved from [http://dspace.unia.es/bitstream/handle/10334/1830/0321\\_Carrion.pdf?sequence=1](http://dspace.unia.es/bitstream/handle/10334/1830/0321_Carrion.pdf?sequence=1)
- Cerón, C. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Revista Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 285–293. Retrieved from <http://www.beisa.dk/Publications/BEISA Book pdfer/Capitulo 18.pdf>
- Chaouki, W., Leger, D. Y., & Liagre, B. (2009). Citral inhibits cell proliferation and induces apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cells. *Journal of Fundamental & Clinical Pharmacology*, 23, 549–556. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.2009.00738.x>
- Chaudhuri, D., & Sevanan, M. (2012). Phytochemical Composition of the Extracts from *Iresine herbstii* and its Therapeutic use via Antioxidant and a Cytotoxic Potential by Multiple In Vitro Assays. *International Journal of Phytomedicine*, 4, 477–485.
- Chen, C., Hu, S., Luo, D., Zhu, S., & Zhou, C. (2013). Potential antitumor agent from the endophytic fungus *Pestalotiopsis photiniae* induces apoptosis via the mitochondrial pathway in HeLa cells. *Oncology Reports*, 30, 1773–1781. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2618>
- Chen, Y., Tseng, S., Lai, H., & Chen, W. (2004). Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice. *Elsevier*, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2004.01.017>
- Cole, J., England, K., Madalene, H., Lorraine, K., Langan, M., Sandy, M., ... Tucker, A. (2006). Pelargoniums. An Herb Society of America Guide. *Revista of The Herbal Society of America*, 44094(440), 1–57.
- Cueva, R. (2014). *Estudio del tipo de muerte celular inducido por la Dehidroleucodina en la células de Astrocitoma Cerebral (D-384).* Universidad Técnica Particular de Loja.
- Cumbajín, S. (2008). *Propuesta de creación de una ruta gastronomica en la provincia de Loja.* Universidad Tecnológica Equinoccial.

- Dangkong, D., & Limpanasithikul, W. (2014). Effect of citral on the cytotoxicity of doxorubicin in human B-lymphoma cells. *Revista of Pharmaceutical Biology*, 209(February), 1–8. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.914233>
- Das, U. N. (2007).  $\gamma$ -linolenic acid therapy of human glioma-a review of in vitro , in vivo , and clinical studies. *Journal of Med Sci Monit*, 13(7), 119–132.
- De la Torre, L., Alarcón, D., Kvist, P., & Salazar, J. (2008). Usos medicinales de las plantas. *Enciclopedia de Las Plantas Útiles Del Ecuador*, 105–114.
- de Sousa, A. C., Alviano, D. S., Blank, A. F., Alves, P. B., Alviano, C. S., & Gattass, C. R. (2004). Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(2002), 677–681. <https://doi.org/10.1211/0022357023321>
- Dickerson, L., Jain, A., Crowell, P. L., Lai, J. C., & Bhushan, A. (2012). Inhibition of glioblastoma cell growth with the isoprenoids perillyl alcohol, farnesol, and geraniol. *American Association for Cancer Research*, 72(8), 1930.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & C., V. (2006). Food Chemistry Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Journal Elsevier of Food Chemistry*, 97, 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>
- Dudai, N., Weinstein, Y., Krup, M., Rabinski, T., & Ofir, R. (2005). Citral is a new inducer of caspase-3 in tumor cell lines. *Planta Medica*, 71(5), 484–488. <https://doi.org/10.1055/s-2005-864146>
- Duncan, R. E., Lau, D., El-sohemy, A., & Archer, M. C. (2004). Geraniol and  $\beta$ -ionone inhibit proliferation , cell cycle progression , and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. *Journal of Biochemical Pharmacology*, 68, 1739–1747. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.06.022>
- Echavarría, A., D´Armas, H., Nubia-Lisbeth, Matute-L., Jaramillo, C., Rojas-de-Astudillo, L., & Benítez, R. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. *Revista Ciencia UNEMI*, 9, 29–35.
- Elmore, S. (2014). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Journal of Toxicologic Pathology*, 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Encalada, M. A., Hoyos, K. M., Rehecho, S., Berasategi, I., Navarro-Blasco, Í., Cavero, R. Y., & Calvo, M. I. (2011). Anti-proliferative Effect of Melissa officinalis on Human Colon

- Cancer Cell Line. *Journal of Plant Foods for Human Nutrition*, 66(4), 328–334.  
<https://doi.org/10.1007/s11130-011-0256-y>
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2005). Apoptosis , Pyroptosis , and Necrosis : Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Journal of Infeccion and Inmunity*, 73(4), 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907>
- Freshney, R. (2011). *Culture of animal cell. A manual of basic technique* (Sexta Edic). New York.
- Gagliano, N., Aldini, G., Colombo, G., Rossi, R., Colombo, R., Gioia, M., ... Dalle-donne, I. (2010). The potential of resveratrol against human gliomas. *Journal of Anticancer Drugs*, 21(2), 140–150. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32833498f1>
- Gandía-herrero, F., Escribano, J., & García-carmona, F. (2014). Biological Activities of Plant Pigments Betalains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37–41. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.740103>
- Garcés, A., & Torres, E. (2010). El Escaramujo . Propiedades y uso terapeutico. *Medicina Naturista*, 4(1), 44–52. Retrieved from file:///C:/Users/Faby/Downloads/Dialnet-EIescaramujo-3142854.pdf
- Guamán, L. (2012). Chronicles of a Silent Death : Apoptosis. *Research in Cell Biology*, 1(1), 1–7. <https://doi.org/10.5923/j.cellbiology.20120101.01>
- Hajighasemi, F., Hashemi, V., & Khoshzaban, F. (2011). Cytotoxic effect of Mentha spicata aqueous extract on cancerous cell lines in vitro. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20), 5142–5147.
- Halabi, M. F., & Sheikh, B. Y. (2014). Anti-Proliferative Effect and Phytochemical Analysis of Cymbopogon citratus Extract. *Journal of BioMed Research Internationa*, 8.
- Hall, V., Rocha, M., & Rodríguez, E. (2002). Plantas medicinales. *Centro Nacional de Información de Medicamentos*, 2, 135.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Elsevier*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2011). Cáncer. *Egresos Hospitalarios*, 2011. Retrieved from <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Infografias/infocancer.pdf>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2007). La quimioterapia y usted. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/educacion-para->

pacientes/quimioterapia-y-usted

Instituto Nacional del Cáncer. (2008). Radioterapia para cáncer. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia/hoja-informativa-radioterapia>

Instituto Nacional del Cáncer. (2015a). Cirugía. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/cirugia>

Instituto Nacional del Cáncer. (2015b). Quimioterapia. Retrieved from <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/quimioterapia>

Jahanban-Esfahlan, A., Modaeinama, S., Abasi, M., Abbasi, M. M., & Jahanban-Esfahlan, R. (2015). Anti proliferative properties of *Melissa officinalis* in different human cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(14), 5703–5707. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.14.5703>

Jakubowicz-gil, J., Langner, E., Wertel, I., Piersiak, T., & Rzeski, W. (2010). Temozolomide , quercetin and cell death in the MOGGCCM astrocytoma cell line. *Journal of Chemico-Biological Interactions*, 188(1), 190–203. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.07.015>

Jaramillo, E. (2016). *Modulación de las proteínas de la familia de p53 en células de cáncer de mama al ser expuestas al [(E) -4- (5-hidroxi-6- (3- (4-hidroxifenil) acriloil) - 2-metil-2H-cromen-2-il) butan-2-ona]*. Universidad Tecnica Particular de Loja.

Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Kiwaki, N., & Nakayama, T. (2010). Curcumin dramatically enhances retinoic acid-induced superoxide generating activity via accumulation of p47-phox and p67-phox proteins in U937 cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*, 395(1), 61–65. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.136>

Kim, S., Cheol, H., Park, E., Ryun, C., Kim, B., Lee, S., ... Jeon, J. (2011). Geraniol inhibits prostate cancer growth by targeting cell cycle and apoptosis pathways. *Journal of Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(1), 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.124>

Langner, J. J. E. (2013). Quercetin and Sorafenib as a Novel and Effective Couple in Programmed Cell Death Induction in Human Gliomas. *Neurotox Res*, 14. <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9452-x>

Lasagni, R. M., Reides, C. G., Ferreira, M., & Llesuy, S. F. (2013). Function extracts against brain lipid-peroxidation. *Journal of Food & Function*, 7. <https://doi.org/10.1039/c3fo60392j>

- Lemus, M. (2015). *Evaluar la calidad del ecosistema marino costero de la provincia de El Oro, utilizando como biosensro dos invertebrados representativos de la zona costera: Litopenaeus vannamei y Anadara tuberculosa*. Universidad Tecnica de Machala.
- Leonita, I., Utami, N. V., & Wibisono, Y. (2015). Spinach Effects ( *Amaranthus hybridus* ) on Spatial Memory. *Althea Medical Journal*, 2, 90–95.
- Linares, N. (2013). Plantas Medicinales. *Taller de Farmacia de La Naturaleza*, 67. Retrieved from [http://www.fademur.es/\\_documentos/ponencias/Ponencia\\_Fademur\\_farmacia\\_OK.pdf](http://www.fademur.es/_documentos/ponencias/Ponencia_Fademur_farmacia_OK.pdf)
- Liou, G.-Y., & Storz, P. (2014). *Reactive oxygen species in cancer* (Vol. 44). <https://doi.org/10.3109/10715761003667554>.Reactive
- Lizarbe, M. A. (2007). El suicidio y la muerte celular. *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fis.Nat.*, 101, 1–33.
- López, M., Juárez, E., Medel, J., Alvarez, D. M., Zamora, R., Estudillo, C., ... Manzo, J. (2012). Necrosis Neuronal Programada. *Revista Medica Universidad Veracruzana*, 52(228).
- Lopez, V., Martín, S., Gomez-Serranillos, M. P., Carretero, M. E., Jager, A. K., & Calvo, M. I. (2009). Neuroprotective and neurological properties of melissa officinalis. *Neurochemical Research*, 34(11), 1955–1961. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-9981-0>
- Loraine, S., & Mendoza-Espinoza, J. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer , relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18–27.
- Mahmood, T., & Yang, P. (2012). Western Blot : Technique , Theory , and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 7–12. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Maldonado, A. C. (2010). *Mecanismos moleculares de la muerte celular inducida por privación de glucosa*. Universidad de Barcelona. Retrieved from [http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2322/ACM\\_TESIS.pdf?sequence=1](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2322/ACM_TESIS.pdf?sequence=1)
- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W. X., Corazzari, M., & Vousden, K. H. (2004). p73 Induces Apoptosis via PUMA Transactivation and Bax Mitochondrial Translocation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 8076–8083. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307469200>
- Melino, G., Laurenzi, V. De, & Vousden, K. H. (2002). p73 : Friends or foe in tumorigenesis. *Nature Reviews*, 2(August), 1–11. <https://doi.org/10.1038/nrc861>

- Mirzayans, R., Andrais, B., Scott, A., Wang, Y. W., & Murray, D. (2013). Ionizing Radiation-Induced Responses in Human Cells with Differing TP53 Status. *Internacional Journal of Molecular Sciences*, 14, 22409–22435. <https://doi.org/10.3390/ijms141122409>
- Moreno, E., Garcia, C., & Dueñas, A. (2000). Metodos de deteccion de la apoptosis, aplicaciones Y Limitaciones. *Revista Del Instituto Nacional de Cancerologia (Mexico)*, 46(4), 275–280.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Motaleb, M. A. (2011). Selected Medicinal plants of chittagong hill tracts. Retrieved from [http://cmsdata.iucn.org/downloads/medicinal\\_plant\\_11\\_book.pdf](http://cmsdata.iucn.org/downloads/medicinal_plant_11_book.pdf)
- Munoz, D., & Cuca, L. (2015). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*, 11.
- Negrelle, R., & Gomes, E. (2007). *Cymbopogon citratus* ( DC .) Stapf : chemical composition and biological activities. *Rev. Bras.Pl. Med.*, 9(1), 80–92.
- Palacio-Arpi, M. A. (2016). *Actividad anti-genotóxica mediante ensayo cometa de la horchata expendida en los mercados de Loja*. Universidad Tecnica Particular de Loja.
- Parada, D. (2012). *Efecto citotóxico de resveratrol y ácido nordihidroguayarático sobre las líneas celulares leucémicas humanas, HL-60 y U937*. Universidad Austral de Chile.
- Patel, P. B., Thakkar, V. R., & Patel, J. S. (2015). Cellular Effect of Curcumin and Citral Combination on Breast Cancer Cells : Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest. *Journal of Breast Cáncer*, 18(3), 225–234.
- Pesee, M., Kirpon, W., Puapairoj, A., Kirpon, S., & Prathnadi, P. (2008). Tratamiento paliativo del cáncer cervical avanzado mediante radioterapia y fitoterapia tailandesa como tratamiento de apoyo. *The Asean Journal of Radiology*, XIII(lii), 171–184.
- Placzek, W. J., Wei, J., Kitada, S., Zhai, D., Reed, J. C., & Pellecchia, M. (2010). A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy PUMA. *Journal of Cell Death and Disease*, 1(5), e40-9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.18>
- Promega. (2012). *One Solution Cell Proliferation Assay CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*.
- Puatanachokchai, R., Kishida, H., Denda, A., Murata, N., Konishi, Y., Vinitketkumnien, U., &

- Nakae, D. (2002). Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus*, Stapf) extract on the early phase of hepatocarcinogenesis after initiation with diethylnitrosamine in male Fischer 344 rats. *Cancer Letters*, 183(1), 9–15. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00111-8](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00111-8)
- Puertas, M., Montoya, J., & Rivera, F. (2012). Capacidad antioxidante in vitro de comfrey (*Symphytum officinale* L.). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 30–36. Retrieved from <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84856837902&partnerID=40&md5=f75b475a151a3e8ed26fa9eaf11409ca>
- Queiroz, R., Takiya, C., Guimarães, L. P., Tavares, P., Rocha, G. da G., Alviano, D. S., & Gattass, C. R. (2014). Apoptosis-inducing effects of *Melissa officinalis* L. essential oil in glioblastoma multiforme cells. *Journal of Cancer Investigation*, 32(6), 226–35. <https://doi.org/10.3109/07357907.2014.905587>
- Ramos, S. (2008). Cancer chemoprevention and chemotherapy: Dietary polyphenols and signalling pathways. *Journal of Mol. Nutr. Food Res.*, 52, 507–526. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200700326>
- Rashidi, M., Malekirad, A., Abdollahi, M., & Habibollahi, S. (2014). The Effect of Tea-Cinnamon and *Melissa officinalis* L. Aqueous Extraction, on Neuropsychology Distress, Biochemical and Oxidative Stress Biomarkers in Glass Production Workers. *Health*, (6), 2592–2601.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified Annexin V / Propidium Iodide Apoptosis Assay For Accurate Assessment of Cell Death. *Journal of Visualized Experiments*, (April), 3–6. <https://doi.org/10.3791/2597>
- Rios, M., Tinitana, F., Jarrín-V, P., Donoso, N., & Romero-Benavides, J. C. (2017). “Horchata” drink in Southern Ecuador: medicinal plants and people’s wellbeing. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13(18), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0145-z>
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica* (1era ed.). Mexico.
- Romero, X. (2014). *Características moleculares de pacientes con astrocitoma. Unidad de Hemato-oncología pediátrica “Dra. Teresa Vanegas” del Hospital universitario “Dr. Ángel Larralde” periodo 2008- 2012*. Universidad de Carabobo.
- Sahu, R. P., Batra, S., & Srivastava, S. K. (2009). Activation of ATM / Chk1 by curcumin causes cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Journal of*



*Cancer*, 100(9), 1425–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605039>

Sánchez, L., & Diosdado, F. (2003). Apoptosis : el fenómeno y su determinación. *Rev Tec Pec Mex*, 41(1), 49–62.

Santos, W. (2015). “*Estudio de factibilidad para la creación de una empresa dedicada a la producción y comercialización de infusiones y bebidas de horchata agroecológica a establecerse en el cantón Nabón.*” Universidad politécnica Salesiana.

Saraydin, S., Tuncer, E., Tepe, B., Karadayi, S., Duman, M., & Turan, M. (2012). Antitumoral Effects of *Melissa officinalis* on Breast Cancer in Vitro and in Vivo. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(6), 2765–2770.

Scoumanne, A., Harms, K. L., Chen, X., Harms, K. L., & Chen, X. (2017). Structural Basis for Gene Activation by p53 Family Members. *Journal of Cancer Biology Y Therapy*, 1178–1185. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.11.2254>

Scovassi, I., & Guamán, L. M. (2013). Traditional Medicine: An Ancient Remedy Rediscovered. *Journal of Biochemistry & Pharmacology: Open Access*, 2(1), 2–4. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000110>

Sharma, V., Hussain, S., & Gupta, M. (2014). In vitro anticancer activity of extracts of *Mentha Spp* . against human cancer cells. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, 51(October), 416–419.

Sharopov, F. S., Zhang, H., & Setzer, W. N. (2014). Composition of geranium ( *Pelargonium graveolens* ) essential oil from Tajikistan. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 2(2), 13–16.

Sienkiewicz, M., Głowaka, A., Kowalczyk, E., Józwiak-Bębenista, A. W.-O. M., & Monika Łysakowska. (2014). The Biological Activities of Cinnamon, Geranium and Lavender Essential Oils. *Molecules*, 19, 20929–20940. <https://doi.org/10.3390/molecules191220929>

Smeenk, L., Van Heeringen, S., Koeppeel, M., Gilbert, B., & Janssen-Megens, E. (2011). Role of p53 Serine 46 in p53 Target Gene Regulation. *PLOS ONE*, 6(3), 17574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017574>

Sociedad Americana contra el Cáncer. (2016). Qué es el cáncer? Retrieved from <http://www.cancer.org/espanol/cancer/aspectosbasicossobreelcancer/que-es-el-cancer>

Tinitana, F. (2014). *Composición florística y etnobotánica de las diferentes formaciones vegetales de la provincia de Loja*. Universidad Politécnica de Madrid.

- Tiwari, M. (2011). Apoptosis and survival. *Indian Journal of Human Genetics*, 17(3), 120–125. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.92081>
- Torre, L., Bray, F., Siegel, R., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *A Cancer Journal for Clinicians*, 65, 87–108.
- Tumbas, V. T., Čanadanović-Brunet, J. M., Četojević-Simin, D. D., Četković, G. S., Dilas, S. M., & Gille, L. (2012). Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6), 1273–1281. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4695>
- Tyagi, A., Singh, R. P., Agarwal, C., Siriwardana, S., Sclafani, R. A., & Agarwal, R. (2005). Resveratrol causes Cdc2-tyr15 phosphorylation via ATM / ATR – Chk1 / 2 – Cdc25C pathway as a central mechanism for S phase arrest in human ovarian carcinoma Ovar-3 cells. *Journal of Carcinogenesis*, 26(11), 1978–1987. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi165>
- Urbina, A. (2012). "Elaboración de un fitofármaco sólido con propiedades adelgazantes preparado con diferentes dosis a base de alcachofa (*Cynara cardunculus* var *scolymus*), Jengibre (*Zingiber officinale*) y apio (*Apium graveolens*) administrado a personas para comparar su efic. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2599/1/56T00376.pdf>
- UTPL. (2013). Refrescarse saludablemente. Retrieved from <http://www.utpl.edu.ec/comunicacion/refrescarse-saludablemente/>
- Vasquez, O., Alva, A., & Marreros, J. (2001). Extracción y caracterización del aceite esencial de Jengibre (*Zingiber officinale*). *Revista Amazonica de Investigacion Alimentaria*, 42, 38–42.
- Villamagua, R. (2014). La horchata: la bebida de color "escancel." *Revista Patrimonio Cultural Inmaterial*, 28–31.
- Vivanco, L. (2014). *Estudio de la cadena productiva en la fábrica de horchatas de la asociación artesanal de plantas medicinales "la laureñita" (asaplameII)*. Universidad Nacional de Loja.
- Weidner, C., Rousseau, M., Plauth, A., Wowro, S. J., Fischer, C., Abdel-Aziz, H., & Sauer, S. (2015). Melissa officinalis extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine*, 22(2), 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.12.008>

- Wong, R. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30, 1–14.
- Woo, J., Kim, Y., Choi, Y., Kim, D., Lee, K., Bae, J. H., ... Kwon, T. K. (2003). Molecular mechanisms of curcumin-induced cytotoxicity : induction of apoptosis through generation of reactive oxygen species , down-regulation of Bcl-X L and IAP , the release of cytochrome c and inhibition of Akt. *Journal of Carcinogenesis*, 24(7), 1199–1208. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgg082>
- World Health Organization. (2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. *Organizacion Mundial de La Salud. Ginebra.*, 72. Retrieved from <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- World Health Organization. (2012). Cancer. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Xia, H., Liang, W., Song, Q., & Nb, Á. B. Á. (2013). The in vitro study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. *Journal of Cytotechnnology*, 65, 49–57. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9453-2>
- Zamorano-Ponce, E., Fernández, J., Vargas, G., Rivera, P., & Carballo, M. A. (2004). Protective activity of cedron (*Aloysia triphylla*) infusion over genetic damage induced by cisplatin evaluated by the comet assay technique. *Journal of Toxicology Letters*, 152(1), 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.002>
- Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., Liu, X., & Wu, N. (2010). Activities of Ten Essential Oils towards *Propionibacterium acnes* and PC-3, A-549 and MCF-7 Cancer Cells. *Journal of Molecules*, 3200–3210. <https://doi.org/10.3390/molecules15053200>

## **ANEXOS**

**ANEXO 1. Porcentajes de cada especie que compone a las distintas horchatas expandidas en los principales mercados de Loja.**

N o	Familia	Especie	Nombre común	Mercado mayorista			Centro comercial			Feria libre Gran Colombia			Estructura morfológica	Usos terapéuticos (General)	Usos terapéuticos (Según Rios <i>et al, 2017</i> )	Referencia
				1	2	3	1	2	3	1	2	3				
				H1 (%)	H6 (%)	H7 (%)	H2 (%)	H5 (%)	H8 (%)	H3 (%)	H4 (%)	H9 (%)				
1.	Lamiace ae	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca blanca		1		6.3						Hojas y flores.	Anti- inflamatoria, anti- espasmódica, anti-tusígeno, anti- flatulencia, cefalea, oído, digestivo, problemas del corazón, nervios, estimulante de lactancia, febrífugo.	a, f ,h y j.	(Arango, 2013; De la Torre et al., 2008; Vivanco, 2014)
2.	Lamiace ae	<i>Ocimum campechian um</i> Mill.	Albahaca negra				2.9						Hojas y flores	Digestivo, febrífugo, nube ocular, cólico menstrual, baño posparto.	a, d, e, f y k.	(Cerón, 2006)
3.	Brassica ceae	<i>Mathiola incana</i> (L.) R. Br.	Alelias	1		0.2							Hojas y Flores.	Anti- inflamatorio, calmante, digestivo, antitusígeno.	a, e, f, h y j.	(Cerón, 2006)
4.	Amarant haceca	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Ataco		4.2		5.3		11.1	5.7		19.7	Inflorescencia y hoja joven	Astringente, Anti- hemorrágico,	b, e, g y k.	(Carrión, 2012; Vivanco, 2014)

												cicatrizante, neuroprotección, diurético, emenagogo.				
5.	Borraginaceae	<i>Borago officinalis</i>	Borraja	18.8		5.1	5.9	12.3	11.3	41.2	Hojas y flores	Anti - inflamatorio, anti-gripal, anti-tusígeno, expectorante, anti-dismenorreico, febrífugo, circulación, sudorífica, astringente, diurética, hipocolesterolemiante.	a, b, e y d.	(Arango, 2013; Carrión, 2012; Cerón, 2006; De la Torre et al., 2008; Hall, Rocha, & Rodríguez, 2002)		
6.	Tiliaceae	<i>Triumfetta althaeoides</i> Lam.	Cadillo	10	3.3	7.7	9.2			10.5	Flores, hojas y tallos.	Astringente y diurético.	-	(Carrión, 2012)		
7.	Verbenaceae	<i>Aloysia triphylla</i> (L'Her.) Britton	Cedrón		1.3		5.7			1.4	Hojas, flores y tallos	Anti-espasmódico, anti-neurálgico, neuroprotección, calmante, cardiotónico, digestivo y tónico estomacal y pectoral.	a, c, f y h.	(Carrión, 2012; De la Torre et al., 2008; Vivanco, 2014)		
8.	Cariophyllaceae	<i>Dianthus caryophyllus</i>	Clavel			0.3				0.6	Pétalos, hojas y flores.	Anti-tusígeno, calmante.	a, b y h.	(Carrión, 2012)		
9.	Equisetaceae	<i>Equisetum bogotense</i> Kunth	Cola caballo	6.4		1.2	5.9			0.9	6.6	5.3	Tallos y hojas.	Anti-inflamatorio y diurético.	b, g y l.	(Carrión, 2012; De la Torre et al., 2008)
10.	Equisetaceae	<i>Equisetum giganteum</i>	Cola caballo							7.3	Tallos y hojas	Anti-inflamatorio, cáncer y tos.	b, g y l	(Cerón, 2006)		
11.	Piperaceae	<i>Peperomia inaequalifolia</i> Ruiz & Pav.	Congona grande			7.7					10.9	Hojas, flores y tallos.	Dolor de oído, anti-parasitario, anti sudorífico,	a, g, h y j.	(Carrión, 2012)	

12.	Proteaceae	<i>Oreocallis grandiflora</i> (Lam.) R.Br.	Cucharillo						2.3	5.5			Flores.	insomnio, analgésico. Anti-inflamatorio, astringente, diurético.	b, f y g.	(Carrión, 2012; Vivanco, 2014)
13.	Amaranthaceae	<i>Iresine herbstii</i> Hook.	Escancel	13.2	33.3	11.3	11.2	7.3	23.1	8.5	14.7	12.2	Hojas, raíces y flores( ocasionalmente)	Analgésico, anti-gripal, calmante, diurético, tonificante, cicatrizante.	a, b, e, g, h y k.	(Carrión, 2012; Vivanco, 2014)
14.	Geraniaceae	<i>Pelargonium odoratissimum</i>	Esencia de rosa		2.0	4.1							Hojas y flores	Tonificante.	-	(Carrión, 2012)
15.	Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf	Hierba luisa	5.1		7.3		6.8	9.9	5.7	2.6	1.2	Hojas.	Digestivo, anti-flatulencia, sedante, neuroprotección expectorante, espasmolítico y diurético.	a, f, g y h.	(Carrión, 2012; Vivanco, 2014)
16.	Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i> . P. Mill	Hinojo		2.0	6.4	4.4	2.9					Hojas	Anti-inflamatorio, digestivo, conjuntivitis, para tratar la diabetes y usado en la lactancia.	a, f, g, k y l.	(Cerón, 2006; Linares, 2013; Tinitana, 2014)
17.	Linnaceae	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Linasa		2.0	7.3		3.3				3.5	Semillas.	Anti – inflamatorio, diurético.	b, f y g.	(Carrión, 2012)
18.	Plantaginaceae	<i>Plantago major</i> L.	Llanten	5.3	2.0	9.3	12.2	10.8	6.7	7.5	8.9		Planta entera.	Anti-inflamatorio, Anti-hemorrágico, digestivo, problemas del hígado, cicatrizante, heridas, picaduras de insectos,	b, f y g.	(Arango, 2013; Carrión, 2012; Linares, 2013)

														inflamaciones bucales, diurético.		
19.	Malvacea	<i>Lavatera arborea</i>	Malva blanca grande	14.7	13.6		12.5	14.5	9.1	11.3		5.8	Hojas y flores	Depurativo, tónico, anticancerígeno.	-	(Carrión, 2012; Cerón, 2006)
20.	Malvaceae	<i>Malva parviflora</i> L.	Malva coche rosada		16.6					2.8	20.6		Hojas y flores.	Anti-inflamatoria, anti-diarreico, febrífugo, diurético, antitusígeno, obesidad, picaduras de insectos.	-	(Alarcón, 2011; Arango, 2013; Bertero, Serra, Verdu, & Trillo, 2009)
21.	Geraniaceae	<i>Pelargonium graveolens</i> L'Herit.	Malva olorosa (grande)	15.7	5.3	7.1	5.7	8.9	16.3	15.1	4.0	7.2	Hojas y flores.	Febrífugo, diabetes, diarrea, problemas de vesícula biliar e hígado, digestivo, úlceras gástricas, heridas, quemaduras, enfermedades respiratorias, ictericia, esterilidad, y cálculos urinarios.	a, b, d y f.	(Cole et al., 2006; Sharopov, Zhang, & Setzer, 2014)
22.	Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i> L.	Manzanilla	3.2	2.0			6.5	0.8	4.7	6.4	2.6	Flores, tallos y hojas.	Anti-flatulencia, anti-inflamatorio, anti-gripal, febrífugo, digestivo, calmante, calambres, cicatrizante, heridas, quemaduras, tónico	a, b, d y e.	(Alarcón, 2011; Carrión, 2012; Hall et al., 2002; Vivanco, 2014)



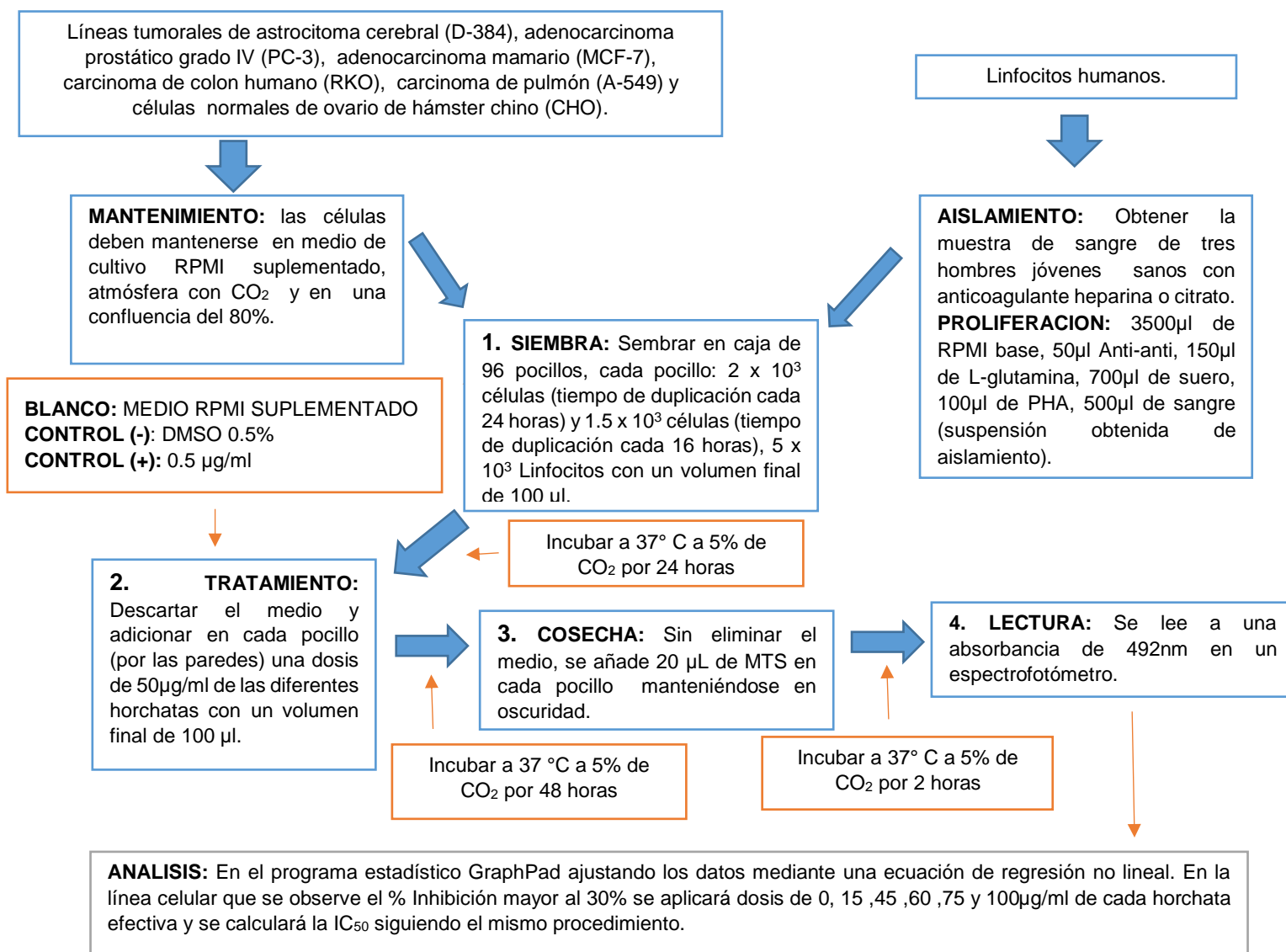
											estimulante, antialérgica, insomnio, vermífuga.			
23.	Lamiaceae	<i>Mentha spicata</i> L.	Menta, hierba buena (pubescente)	1.3		4.5	0.6	7.5	4.7	1.5	Hojas y tallos.	Anti-espasmódico, anti-flatulento, digestivo, cólicos, calmante.	a, b, d, e, f y k.	(Arango, 2013)
24.	Lamiaceae	<i>Mentha x piperita</i> L.	Menta, menta negra (casa)	2.6	0.7	3.2				1.8	Hojas y tallos.	Anti-inflamatorio, anti-flatulencia, febrífugo, problemas del hígado y vesícula biliar, nervios, calambres, antiespasmódico, digestivo.	a, b, d, e, f y k.	(Arango, 2013; Carrión, 2012; Hall et al., 2002)
25.	Solanaceae	<i>Solanum americanum</i> Mill.	Mortino	3.8						0.9	Hojas y frutos.	Sistema Respiratorio.	-	(Tinitana, 2014)
26.	Onagraceae	<i>Fuchsia magellanica</i> Lam	Pena pena blanca morada simple	1.9	1.2	1.7			2.6		Hojas y flores.	Diurético, febrífugo, purgante, tónico general, emenagogo.	-	(Aukanaw, 2007; Tinitana, 2014)
27.	Onagraceae	<i>Fuchsia hypoleuca</i> Hort.	Pena pena blanca rosada	4.0	1.9	4.4					Flores	Diurético.	-	(Tinitana, 2014)
28.	Onagraceae	<i>Fuchsia hybrida</i>	Pena pena grande		0.8	8.3					Pétalos.	Calmante y tonificante	b, e, f, j y h.	(Carrión, 2012)
29.	Rosaceae	<i>Rosa canina</i>	Rosa simple rosada blanca	1.1	0.5						Pétalos	Anti-gripal, anti-escorbútica, digestivo, astringente, diurética.	-	(Garcés & Torres, 2010)

30.	Onagraceae	<i>Oenothera rosea</i> L'Her. ex Aiton.	Shullo	4.5	3.2					Talos, flores y hojas,	Anti-inflamatorio, diurético, febrífugo.	-	(Carrión, 2012)
31.	Borraginaceae	<i>Simphytum officinale</i>	Suelda consuelida			1.9				Hojas y raíz.	Anti inflamatorio, demulcente, hipotensor, estimulante del tejido y nervios, astringente, diurético, hemostática.	-	(Hall et al., 2002; Puertas, Montoya, & Rivera, 2012)
32.	Adoxaceae	<i>Sambucus nigra</i> L.	Tilo	6.4	4.7		0.6	3.8	2.6	Flores	Antigripal, bronquitis, resfrios, calmante, febrífugo, diarrea, cefalea.	e y h.	(Cerón, 2006; Linares, 2013; Tinitana, 2014)
33.	Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i> L.	Toronjil	4.5	1.7	12.2	0.8	8.5		Hojas y tallos	Anti-espasmódico, anti-gripal, diurética, ulceraciones, digestivo, calmante y sedante, resfriados, cólicos, flatulencia, alergias, sudorífico, insomnio, problemas del corazón, neuroprotección, hemorroides y tónico.	a, b, c, f y h.	(Alarcón, 2011; Arango, 2013; Carrión, 2012; De la Torre et al., 2008; Linares, 2013; Vivanco, 2014)

**H:** Horchata. 1, 2, 3: Numero de repeticiones de la recolección de las plantas en los mercados. %: concentración en porcentaje de planta que compone a la horchata. a: analgésico, b: anti inflamatorio, c: anti espasmódico, d: anti diarreico, e: anti gripal, f: digestivo o estomacal, g: diurético, h: sedativo, i: hipotensor, j: cardiotónico, k: tónico y l: hepático.

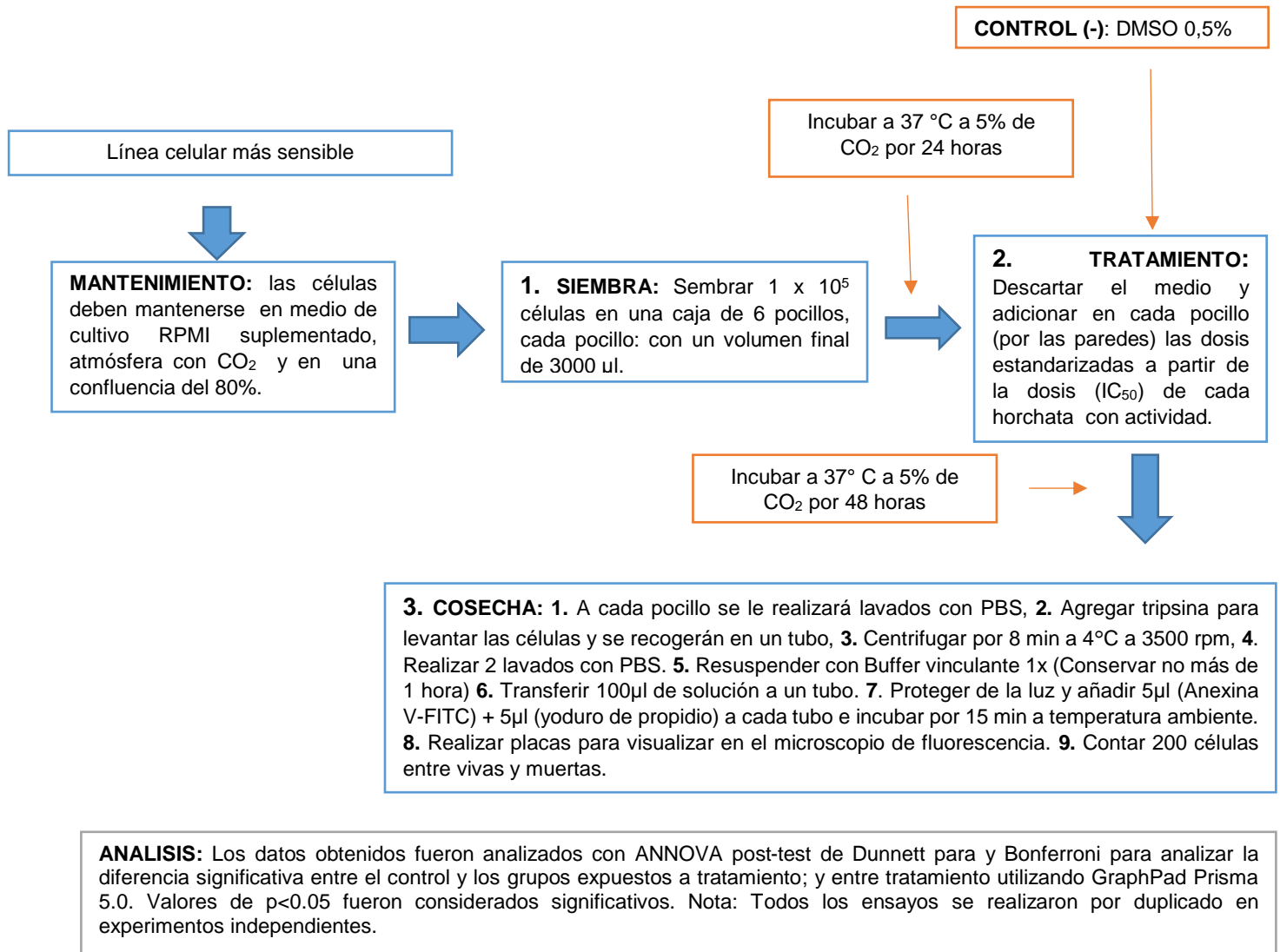
## ANEXO 2. Esquemas de metodología utilizada para realizar el proyecto.

### A2.1. ENSAYO MTS Y DETERMINACIÓN DE IC<sub>50</sub>

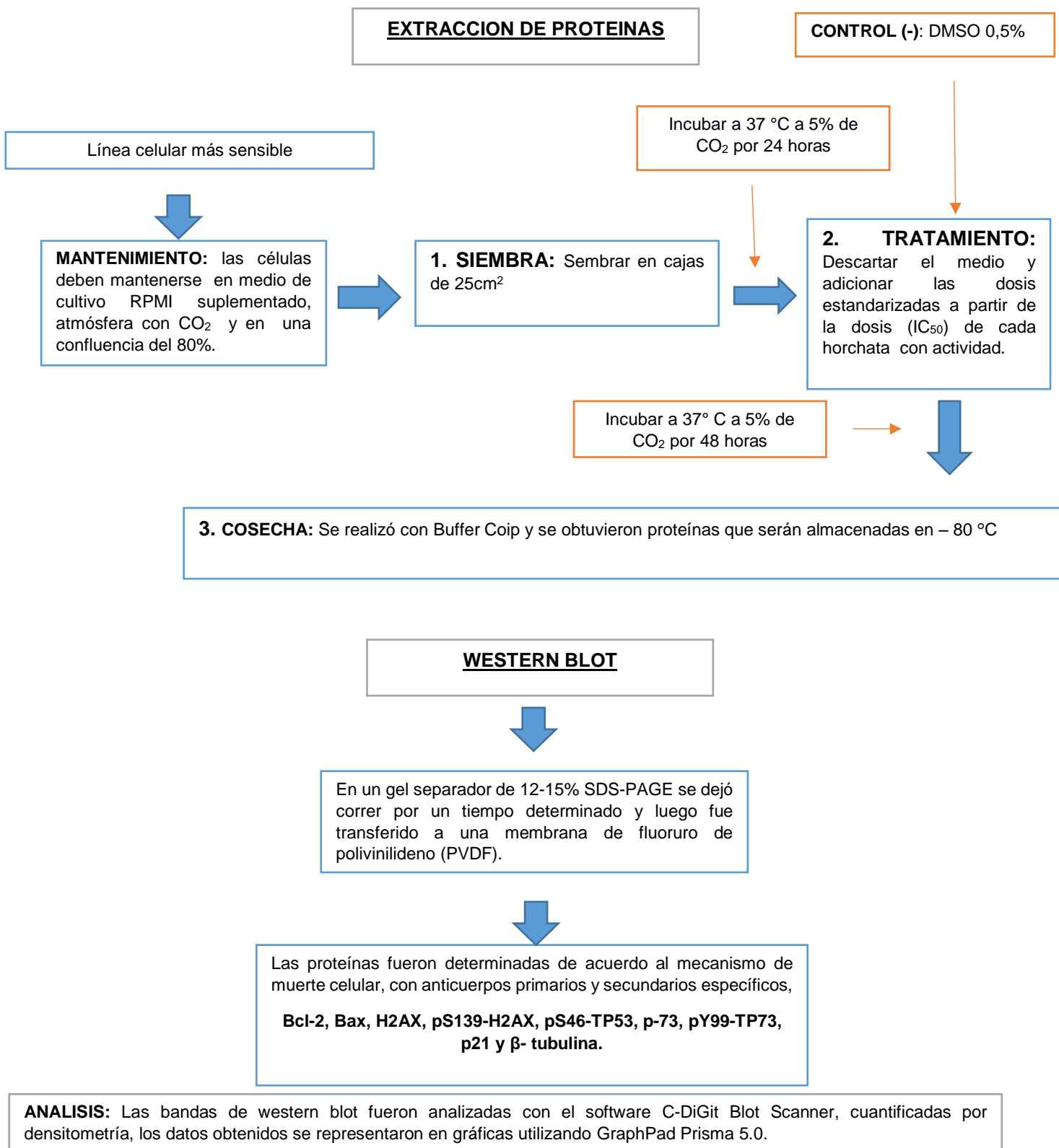


## A2.2. DETERMINAR TIPOS DE MUERTE CELULAR

### A2.2.1. DISTRIBUCIÓN DE FOSFATIDILSERINA: FLUORESCENCIA



## A2.2.2. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS: WESTERN BLOT



**ANEXO 3. Tabla de descripción de anticuerpos primarios y secundarios utilizados para Western Blot.**

<b>ANTICUERPOS</b>					
<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Anticuerpo secundario</b>	<b>Código</b>	<b>Peso Molecular (KDa)</b>	<b>Dilución Recomendada</b>	<b>Casa comercial</b>
	Goat anti-rabbit IgG-HRP <b>(G.A.R)</b>	sc-2004	-	1:500-1:10000	Santa Cruz Biotechnology. Inc
	Goat anti-mouse IgG- HRP conjugate/AP308P, <b>(G.A.M)</b>	AP308P	-	1:2,000-1:5000	EMD Millipore
	Donkey anti-goat IgG-HRP <b>(D.A.G)</b>	sc-2020	-	1:5000-1:10000	Santa Cruz Biotechnology. Inc
<b>Bax (P-19)</b>	G.A.R	sc-526	23	1:200	Santa Cruz Biotechnology. Inc.
<b>Bcl-2 (C-21)</b>	G.A.R	sc-783	26	1:200	Santa Cruz Biotechnology. Inc.
<b>p21 (187)</b>	G.A.M	sc-817	21	1:200	Santa Cruz Biotechnology. Inc.
<b>p-p53 (Ser 46)</b>	G.A.R	sc-101764	53	1:200	Santa Cruz Biotechnology. Inc.
<b>Tp73 (H-79)</b>	G.A.R	sc-7957	73	1:200	Santa Cruz Biotechnology. Inc.
<b>p-p73 (Tyr 99)</b>	G.A.R	sc-101769	73	1:200	Santa Cruz Biotechnology. Inc.
<b>H2A.X (C-20)</b>	D.A.G	sc-54606	15	1:200	Santa Cruz Biotechnology. Inc.
<b>p-p H2A.X</b>	G.A.R	sc-101696	15	1:200	Santa Cruz Biotechnology. Inc.
<b><math>\beta</math>-Tubulina (D-10)</b>	G.A.M	sc-5274	55	1:200	Santa Cruz Biotechnology. Inc.