



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

*La Universidad Católica de Loja*

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**Actividad genotóxica y antigenotóxica mediante el análisis de micronúcleos de la horchata  
expendida en los mercados de Loja.**

**TRABAJO DE TITULACIÓN.**

**AUTORA:** Aguilar Hernández Jessica Krupskaya

**DIRECTORA:** Bailón Moscoso Natalia Catalina

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>*

2017

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

Ph.D.

Natalia Catalina Bailón Moscoso

**DOCENTE DE LA TITULACIÓN**

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Actividad genotóxica y antigenotóxica mediante el análisis de micronúcleos de la horchata expendida en los mercados de Loja realizado por Jessica Krupskaya Aguilar Hernández, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Octubre de 2017

f) \_\_\_\_\_

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo Aguilar Hernández Jessica Krupskaya declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Actividad genotóxica y antigenotóxica mediante el análisis de micronúcleos de la horchata expendida en los mercados de Loja de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, siendo Natalia Catalina Bailón Moscoso directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad. Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f).....

Autor: Aguilar Hernández Jessica Krupskaya

Cédula:1900425206

## DEDICATORIA

Para mí es un honor dedicar este trabajo con gran afecto:

Primeramente a Dios, que me ha guiado con amor en este camino, desde mis inicios y todo lo que él ha logrado en mí a través de todo este tiempo, por ser la fuente inagotable de amor cada vez que veía todo perdido.

A mis Padres, que me han apoyado en todo momento y han sido ese pilar fundamental que siempre necesité, han estado en alegrías y tristezas y más aún el ejemplo de vida de mi madre, por ser guerrera, de día a día luchar y no dejarse derrotar por su enfermedad.

A mis hermanos que me ejercen poder de superación al saber que reflejan en mí un ejemplo a seguir.

A mis abuelitos que desde mi infancia me forjaron bajo el camino de Dios, me guiaron en la vida y con sabiduría me aconsejan cuando no encuentro solución a mis interrogantes.

A mi persona que después de tanto esfuerzo finalmente puedo decir que me siento satisfecha con la investigación que realicé y como persona este trabajo me enseñó a ser paciente, decisiva, fuerte, menos susceptible y responsable.

*El fracaso es la experiencia que precede al triunfo.*

**Gandhi**

## **AGRADECIMIENTOS**

Ph.D. Natalia Bailón Moscoso, por la confianza y el apoyo al brindarme la oportunidad de trabajar junto a su equipo de investigación, influyendo positivamente al desarrollo de mi potencial investigativo y académico.

Al Ph.D. Luis Guamán por ser una excelente persona, guiándome en el transcurso de mi instrucción académica.

A mis compañeras de Laboratorio de Genotoxicología por la enseñanza y por su amistad: Luisa Romero y Ali Idrobo.

A mis compañeros y amigos por compartir momentos inolvidables a lo largo de la carrera.

## INDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	I
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPITULO I. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Medicina Tradicional.....	6
1.2. Plantas Medicinales.....	6
1.3. Horchata.....	6
1.4. Genotoxicidad.....	7
1.5. Antigenotoxicidad.....	7
1.6. Biomarcadores para la determinación de Actividad Genotóxica.....	11
1.6.1. Ensayo de Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.....	11
1.6.2. Micronúcleos.....	11
1.6.3. Criterio de Elección de Micronúcleos.....	12
1.7. Cultivo Celular.....	13
1.7.1. Línea Celular Chinese Hamster Ovary CHO-K1.....	13
2. CAPITULO II. OBJETIVOS DEL PROYECTO.....	15
2.1. Objetivo General.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Obtención del material de Estudio.....	18
3.2. Modelo Biológico y Cultivo Celular.....	18
3.3. Ensayo de Micronúcleos.....	18
3.3.1. Siembra.....	18
3.3.2. Tratamientos.....	18
3.3.3. Cosecha.....	20

3.3.4.	Tinción DAPI.....	20
3.3.5.	Criterios de Análisis de Micronúcleos. ....	20
3.3.6.	Análisis estadístico. ....	21
4.	CAPITULO IV. RESULTADOS.....	22
4.1.	Ensayo Micronúcleos.....	23
4.1.1.	Determinación de Genotoxicidad de los liofilizados de Horchatas y Determinación de Desmutagénesis: cotratamiento.....	23
4.1.2.	Evaluación de Bioantimutagénesis: post tratamiento.....	24
4.2.	Porcentaje de Células.....	24
4.3.	Índice de División Nuclear. ....	25
6.	CONCLUSIONES .....	31
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	32
	ANEXOS.....	40

## ABREVIATURAS

- ADN:** Acido Desoxirribonucleico
- BER:** Escisión de Bases
- CB:** Citocalasina B
- CBMN:** Ensayo de Micronúcleos
- CHO-K1:** Células de ovario de Hamster Chino
- CPA:** Ciclofosfamida
- DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol, 4',6-diamidinofenyl-indol
- DEN:** N-Nitrosodietilamina
- DXR:** Doxorubicina
- EMS:** Etilmetanosulfonato
- HRCH:** Horchata
- HRCHs:** Horchatas
- IDN:** Índice de División Nuclear
- MNNG:** N-Metil-N-Nitro-N-Nitroguanidina
- MNs:** Micronúcleos
- MMC:** Mitomicina C
- MMS:** Metilmetano sulfonato
- OMS:** Organización Mundial de la Salud
- PBS:** Solución Fosfato Salino
- ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno

## RESUMEN

Al sur del Ecuador en la provincia de Loja se mantiene el consumo de la tradicional bebida llamada "horchata" que se elabora a partir de 16 a 32 especies de plantas y hoy en día no solamente la expenden en mercados de la provincia sino que la comercializan en diferentes presentaciones.

Estudios previos indican que 3 diferentes horchatas (HRCH2, HRCH7, HRCH8) de 9 liofilizados tuvieron efecto citotóxico sobre células tumorales de astrocitoma cerebral y mediante ensayo cometa se midió el daño genotóxico y antigenotóxico. El objetivo del estudio fue evaluar su posible efecto genotóxico y/o antigenotóxico de dichas mezclas a una concentración de 1000µg/mL en células CHO-K1 mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis. Se demostró que los liofilizados no tenían un efecto genotóxico, todos presentaron un efecto antigenotóxico desmutágeno, sin embargo como agente bioantimutágeno la HRCH7 mantiene el efecto protector mientras que HRCH2 y HRCH8 presentaron un efecto disminuido. Ninguna de las horchatas probadas modula la proliferación celular, evaluado en el índice de división celular.

**Palabras clave:** horchata, antigenotóxico, micronúcleos, desmutágeno, bioantimutágeno.

## ABSTRACT

To the south of Ecuador in the province of Loja the consumption of the traditional drink called "horchata" is maintained that is elaborated from 16 to 32 plants and nowadays they not only sell it in markets of the province but they commercialize it in different presentations.

Previous studies indicate that 3 different horchatas (HRCH2, HRCH7, HRCH8) of 9 lyophilized had a cytotoxic effect on brain astrocytoma tumor cells and by genotypic and antigenotoxic damage were measured by comet assay. The objective of the study was to evaluate its possible genotoxic and / or antigenotoxic effect of these mixtures at a concentration of 1000µg / mL in CHO-K1 cells by the micronucleus test with blockade of cytokinesis. It was demonstrated that the lyophilizates did not have a genotoxic effect, all presented an antigenotoxic effect demmutágeno, nevertheless like bioantimutágeno agent HRCH7 maintains the protective effect whereas HRCH2 and HRCH8 presented a diminished effect. None of the tested horchatas modulate the cellular proliferation, evaluated in the index of cellular division.

**Key words:** horchata, antigenotoxic, micronuclei, desmutagen, bioantimutagen.

## INTRODUCCIÓN

El consumo de plantas medicinales para usos terapéuticos se han utilizado desde tiempos antiguos, y prevalecen de tal manera que hoy en día se siguen consumiendo (Brugés & Reguero, 2007). Es más la gran mayoría de fármacos tienen principios activos de varios compuestos provenientes de las plantas tradicionalmente usadas para tratar diferentes enfermedades (Avello & Cisternas, 2010).

Hoy está considerado que el 80% de la población alrededor del mundo utiliza las plantas medicinales en el tratamiento de enfermedades según datos registrados en la Organización Mundial de la Salud, además su uso tradicional es generalmente por decocciones de las plantas enteras o de sus partes y no de sus principales componentes aislados y purificados (Sánchez, Fonseca, Capiro, & Fernández, 2000), debido a que utilizar los extractos totales genera un efecto potencialmente beneficioso sobre el organismo humano y produce menos efectos secundarios indeseables (Carballo, Cortada, & Gadano, 2005; Sánchez, 1999). En Ecuador el uso de las plantas medicinales es una tradición que proviene de pueblos indígenas y la mayoría de estas plantas se expenden libremente en mercados locales (Cerón, 2006). La horchata es considerada una mezcla de varios tipos de plantas que de manera individual tienen diferentes efectos beneficiosos sobre la salud, tienen un total de 32 usos terapéuticos y están asociados al tratamiento de síntomas relacionados con el sistema circulatorio, sistemas digestivo y respiratorio entre ellos: antibronquitis, estimulante, antiespasmódico, tónico, cardiotónico, febrífugo, hepático, dolor de estómago, diurético, analgésico, antitusivo, anti-inflamatorio, hipotensor, entre otros (Rios, Tinitana, Jarrín-v, Donoso, & Romero-Benavides, 2017).

Debido al uso masivo de esta bebida, en nuestra ciudad estudiar sobre la genotoxicidad y la capacidad protectora es de gran importancia ya que es una mezcla compleja con una o más acciones terapéuticas, por lo tanto podría estar constituida por compuestos de origen mutagénicos relacionados a procesos carcinogénicos, teratogénicos y modificaciones genéticas (Vizoso, García, & Ramos, 1999) o a su vez por compuestos que den origen a la actividad protectora o antimutagénesis (Arencibia, Rosario, López, & Díaz, 2009). Además evaluar el potencial genotóxico de diversos compuestos adquiere mucha relevancia por su alta correlación entre el daño al ADN y las afectaciones somáticas de diverso origen y naturaleza como el envejecimiento y el cáncer (Remigio, Vega, Piloto, & Rodríguez, 2008).

Por lo mencionado previamente en este trabajo de fin de titulación se evaluaron los posibles efectos que este brebaje generó en el DNA, a través de observar su actividad sobre las células

CHO-K1. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto genotóxico y/o protector de la horchata en la línea celular CHO-K1 mediante el análisis de micronúcleos, técnica que evalúa la capacidad genotóxica de las células en respuesta al tratamiento con el liofilizado de horchata usado.

## **CAPITULO I. MARCO TEÓRICO**

### 1.1. **Medicina Tradicional.**

La medicina tradicional abarca todos los conocimientos, capacidades y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias que se han dado de generación en generación y que son útiles para mantener la salud y prevenir o mejorar enfermedades (Organización Mundial de la Salud, 2013). A nivel mundial el uso de las plantas proviene desde tiempos ancestrales y actualmente se emplean como método alternativo o coadyuvantes de enfermedades e incluso algunos fármacos contienen principios activos obtenidos a partir de plantas (Rios, 2008).

Se estima según estudios de la OMS que cerca del 80% de personas alrededor del mundo utilizan la medicina tradicional como atención primaria de una enfermedad (Carballo *et al.*, 2005), además el uso básico de las especies vegetales son la planta entera, sus partes o compuestos activos aislados de las mismas obtenidas por: decocciones, infusiones, tisanas o maceración (Scovassi & Guamán, 2013).

En el Ecuador la cultura de sus comunidades indígenas hacen del conocimiento tradicional una profunda experiencia de vida, que está conectada al mundo vegetal y a sus propias manifestaciones a través de una cosmovisión particular (Rios, 2008).

### 1.2. **Plantas Medicinales.**

Cuando se habla de plantas medicinales se hace énfasis a su contenido de principios activos, los cuales al ser administrados en dosis adecuadas producen un efecto curativo frente a las enfermedades del hombre (Organización Mundial de la Salud, 2013). Muchas de estas plantas tienen actividad antiinflamatoria, analgésica, antimicrobiana, antiespasmódica, antidiabética, antiviral e incluso antitumoral, es más contienen una amplia variedad de compuestos antioxidantes naturales ejerciendo su efecto por diversos mecanismos (Scovassi & Guamán, 2013).

Ecuador por su alta diversidad biológica y cultural se ha constituido en uno de los países con un gran potencial en lo referente a medicina tradicional, detallándose alrededor de 5172 especies de plantas, de las cuales el 60% se utilizan con fines medicinales (Garzon, 2016). Entre la ciudad de Loja al sur del Ecuador y Zamora Chinchipe se han descrito más de 270 especies de plantas y dentro de estas 75 familias presentan funciones farmacológicas, con efectos beneficiosos en el área de la salud e incluso algunas fueron investigadas científicamente (Bussmann & Sharon, 2015).

### 1.3. **Horchata.**

Existen varias denominaciones de este término, en varios países como España se la denomina horchata a una bebida elaborada a base de leche y arroz, y en México es a base de frutas, sin

embargo en Ecuador en la región sur, esta bebida refrescante se elabora con varias plantas medicinales y hierbas aromáticas a través de la infusión (Marcillo & Naranjo, 2012). En algunos estudios realizados, las especies utilizadas van entre 16 a 32 plantas para poder obtener este preparado medicinal que tiene propiedades diuréticas antiestrés, energizantes, tónico, digestivo, entre otros (Rios *et al.*, 2017). La elaboración se basa en hervir agua y sumergir de 5 a 8 min entre 18 a 25 plantas aproximadamente 25 g. de cada una, al finalizar se la sirve con limón y azúcar al gusto, su consumo puede ser fría o caliente (Fernández & Viracucha, 2014). Además se comercializan en presentaciones de 50 a 100 g. de diversas marcas e incluso se encuentra ya preparada (Marcillo & Naranjo, 2012).

Esta bebida ha existido en el Ecuador andino austral desde la colonia española y es conocida como una tradición en la provincia de Loja, sobre todo entre los indígenas debido al impacto cultural en la población local (Rios *et al.*, 2017). Rios, *et al.*, 2017 menciona 32 distintos usos terapéuticos de las 71 especies de plantas medicinales registradas, las cuales se expenden como material vegetal fresco en 31 mercados de la provincia. El 66% de las especies de plantas medicinales se utilizan como antiinflamatorios, 51% como analgésicos, 42% como diuréticos, y entre 28 y 37% como sedantes, tónicos, digestivos, hepáticos y paliativos. Dentro de las estructuras morfológicas específicas que se usan son: inflorescencias, raíces, semillas, tallo y la planta entera que se vende con menos frecuencia, esto depende de la especie a usar (Rios *et al.*, 2017).

#### 1.4. **Genotoxicidad.**

Se define genotoxicidad como el efecto producido en la célula por acción de moléculas de origen mutágeno (genotoxinas), que destruyen el material genético e inducen a mutaciones en el ADN (Umang, 2012). Evaluar este parámetro es de importancia ya que analiza las diferentes formas de mutaciones como: aberraciones cromosómicas, recombinación y cambios numéricos que se dan al nivel del genoma (Mohammed, Sisodia, Mansori, & Dheeraj, 2014).

Las pruebas pueden ser *in vivo* o *in vitro*, están diseñadas para detectar el daño genético producido tras exposición de genotóxicos, los compuestos con respuestas positivas a estas pruebas se consideran carcinógenos y/o mutágenos para el ser humano (Umang, 2012). Una de las pruebas de evaluación de genotoxicidad es el test de micronúcleos, que mide la capacidad de una sustancia para romper los cromosomas o afectar la formación de la placa metafásica o del huso mitótico, durante la división celular (Alborghetti *et al.*, 2015).

#### 1.5. **Antigenotoxicidad.**

El significado de antigenotoxicidad fue descubierto en 1951 tras realizar un ensayo en donde la presencia de nucleótidos normales en un medio de crecimiento causaba una reducción de la frecuencia de mutaciones de resistencia a fagos en una población bacteriana (Arencibia et al., 2009). Kada define la acción antimutagénica como la capacidad o acción de las sustancias para disminuir o evitar el daño del ADN de la célula (Arencibia et al., 2009). Según Wattenberg en el año 1981, los antimutágenos fueron agrupados en dos grandes categorías: los agentes bloqueadores, que impiden que los carcinógenos alcancen o reaccionen con los sitios diana y los agentes supresores, que previenen la evolución de los procesos neoplásicos (Wattenberg, 1981), entre los agentes bloqueantes se encuentran los agentes desmutágenos y los bioantimutágenos (Arencibia et al., 2009).

El término desmutágeno se refiere a aquellos agentes que actúan en forma directa con el mutágeno, modificando ya sea su estructura química o bioquímica es decir acarreado consigo reacciones de metabolización dentro del organismo antes de que alcance la molécula blanco (Simic, Vukovic-Gacic, Knezevic-Vukcevic, Trininic, & Jankov, 1997). Los bioantimutágenos, son agentes biológicamente activos que interfieren con las funciones celulares que determinan los procesos de mutagénesis o reparación del ADN dañado, provocando disminución de la frecuencia de las mutaciones tanto inducidas como espontáneas (Arencibia et al., 2009).

Para determinar si la actividad antimutagénica de un compuesto investigado es de carácter desmutagénico o bioantimutagénico, el procedimiento consiste en comparar las respuestas mutacionales obtenidas al aplicar tres variantes fundamentales de tratamiento: Cotratamiento (compuesto y mutágeno a la vez), Pre tratamiento (primero el compuesto y a continuación el mutágeno en ausencia del compuesto) y Post tratamiento (primero el mutágeno y a continuación el compuesto) (Arencibia et al., 2009). Como se puede observar en la Tabla 1, en los diferentes estudios en donde pretenden clasificar a los compuestos antimutágenos se analizó que varían los compuestos mutagénicos usados y el tiempo de exposición de los mismos, además los extractos que tenían capacidad protectora se usaban en el tiempo de exposición donde presentaban esa característica.

Hoy en día la investigación de compuestos antimutagénicos lo relacionan con el tratamiento de quimioprevención que tendría como acción reducir la incidencia del cáncer teniendo como objetivo identificar agentes que permitan desarrollar estrategias relacionados con la antimutagénesis (Surh, 2003). Para el uso racional de los agentes quimiopreventivos es esencial no sólo evaluar su utilidad y eficacia sino también indagar sobre los mecanismos involucrados (Rashid, 2017).

**Tabla 1.** Modelos experimentales de diferentes estudios que evalúan tiempos de exposición de los compuesto y extractos usados para ensayos de antigenotoxicidad.

MODELO CELULAR	COMPUESTO GENOTOXICO	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	CITOCALASINA B	TIEMPO DE EXPOSICION	CITOCALASINA + EXTRACTO		EXTRACTO	TIEMPO
					SI	NO		
<b>DESMUTÁGENO: COTRATAMIENTO</b>								
LINFOCITOS	MMC (0.025 µM)	20h	4.5 µg/mL	28h		X	Junto con la Mitomicina	20h
CHO-K1	EMS (310 µg/mL)	3h	3 µg/mL	18h		X	Junto con EMS	3h
<b>BIOANTIMUTÁGENO</b>								
<b>PRETRATAMIENTO</b>								
HepG2 cells	CPA	22h	4.5 µg/mL	20h		X	Pretramamiento	2h antes, y 22h después con CPA
CHO-K1	MMC (1 µM)	1h	1.0 µg/mL	21h		X	Antes de aplicar mitomicina	6h
HepG2	DEN (5 µl/mL) o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.27 mM)	1h o 10 min.	6 µg/mL	48h		X	Antes de DEN o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1h
<b>POST TRATAMIENTO</b>								
HeLa	MMC (4.8 µM)	3h	3 µg/mL	24h		X	Después de Mitomicina C	3h
CHO-K1				15h				

<b>CHO-K1</b>	<b>MMC (4.8 µM) MMS (400 µM) DXR (0.3 µM )</b>	<b>2h</b>	<b>3 µg/mL</b>	<b>3h</b>		<b>X</b>	<b>Después de los compuestos mutagenos</b>	<b>2h</b>
<b>CHO-K1</b>	EMS ( 350 µM)	1h	5 µg/mL	28h		X	Después de EMS	1h
<b>HepG2 cells</b>	MMS (4 × 10 <sup>-2</sup> M)	3h	3 µg/mL	28h		X	Después de MMS	3h
<b>LUNG FIBROBLASTS V79 cells</b>	MMS	2h	-	-			Después de MMS	2h
<b>CHO-K1</b>	MMS ( 4.23 µg/mL)	3h	3 µg/mL	17h	X		Después de MMS	17h
<b>HTC cell</b>	MMS (Disuelto en compuestos etanolicos )	1h	3 µg/mL	30h		X	Después de MMS	3h
<b>HepG2</b>	MNNG	1h	6 µg/mL	24h +24h sin extracto	X		Después de MNNG	24h
<b>NOTA:</b> En los artículos después de aplicar los tratamientos con mutágenos se lava con PBS y luego se añade el extracto.								

**Fuente:** (Nigro, Marcela, & Marta, 2009), (Bellini *et al.*, 2006), (Cao *et al.*, 2007), (Tsong-yun, Li-kang, Yu Chuen, & Su- Hua, 1996), (Scolastici *et al.*, 2008), (J. T. De Oliveira *et al.*, 2017), (Poersch *et al.*, 2007), (Jacociunas *et al.*, 2013), (Hoshina & Marin-Morales, 2014), (Barcelos, Shimabukuro, Maciel, & Cólus, 2007), (R. J. Oliveira *et al.*, 2007), (Roberto, Matsumoto, Jamal, Malaspina, & Marin-Morales, 2016), (Meschini *et al.*, 2015).

**Elaboración:** Autor

## 1.6. **Biomarcadores para la determinación de Actividad Genotóxica.**

Se denomina “biomarcador” a la interacción entre un sistema biológico y un agente de tipo químico, físico o biológico, el cual se evalúa mediante una respuesta funcional o fisiológica, que ocurre a nivel celular o molecular, se encuentran diferenciados en tres tipos: Biomarcadores de Susceptibilidad, de Efecto y de Exposición (Arango, 2012). El Biomarcador de exposición determina en un organismo la presencia de una sustancia exógena, y se puede medir la toxicidad mediante: expresión y actividad de la enzima glutatión-S-transferasa, actividad de la enzima acetilcolinesterasa, cuantificación de proteínas de estrés, síntesis de metalotioneínas, daño en ADN, aductos de ADN, peroxidación lipídica, expresión y actividad del citocromo P450, entre otros (Arango, 2012).

Para evaluar el daño de ADN se utilizan algunas técnicas de estudio como: Test de Azul de Toluidina, Test de Azul de Anilina, CBMN, Test de Aberraciones Cromosómicas, Test de Retardo en Anafase-Telofase, Test de Intercambio de Cromátidas Hermanas, Ensayo Tunel, Ensayo Cometa, Ensayo de ISNT (In situ nick translation), Detección de rotura de ADN-Fish, entre otros (Álvarez, Arellano, & Pérez, 2015).

### **1.6.1. Ensayo de Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.**

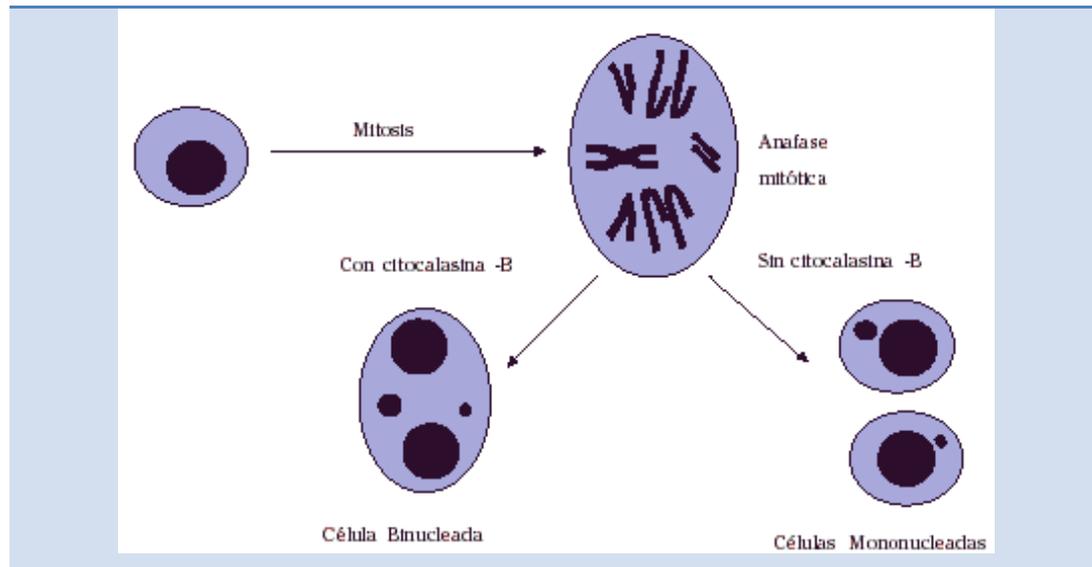
Esta técnica es una de las principales pruebas de genotoxicidad internacionalmente recomendada para la evaluación de la seguridad de los productos, es uno de los métodos preferidos a la hora de valorar confiablemente la rotura de cromosomas y la pérdida de material genético (Mohammed *et al.*, 2014), además tiene sensibilidad individual a la formación de MNs por polimorfismos en un solo gen (Luzhna, Kathiria, & Kovalchuk, 2013). Es un método fiable para medir los daños cromosómicos por agentes citotóxicos *in vivo* e *in vitro* considerándolo como un test estándar de genotoxicidad para hacer seguimientos de agentes para el uso de la población humana (Alborghetti *et al.*, 2015).

### **1.6.2. Micronúcleos.**

Los MNs son corpúsculos que contienen cromatina y se encuentran en el citoplasma, se pueden formar por procesos aneugénicos durante el cambio de metafase a anafase de la mitosis (Torres, Zavala, Macriz, Flores, & Ramos, 2013), derivándose de cromosomas enteros o de fragmentos acéntricos que quedan excluidos durante la anafase mitótica (Zalacain, Sierrasesúmaga, & Patiño, 2005). Para observar este tipo de daño se necesita el bloqueo de la citocinesis a partir de CB, esta sustancia inhibe la polimerización de actina, usado para prevenir el corte citoplasmático (citocinesis) (Zalacain *et al.*, 2005), originando una célula binucleada y

mediante esto sea visible la pérdida de material genético, lo que hace que este método sea independiente de la cinética de división (Luzhna *et al.*, 2013).

En la Figura 1 se evidencia la acción de la CB, al inhibir el desplazamiento de los cromosomas hacia los polos y cuál sería el posible resultado sin su uso.



**Figura 1.** Formación de MNs debido a la pérdida en un cromosoma entero y fragmentos cromosómicos de tipo acrocéntrico en anafase mitótica. El esquema muestra el bloqueo con CB y la consecuente obtención de células binucleadas, sin el cual se observarían células mononucleadas con pérdida cromosómica, siendo imposible diferenciar si se trata de células madres o hijas.

**Fuente y elaboración:** (Zalacain *et al.*, 2005)

### 1.6.3. Criterio de Elección de Micronúcleos.

El objetivo principal del criterio de elección de MNs es verificar la fiabilidad del ensayo, para ello se tomará en cuenta tanto la célula binucleada como los MNs en sí. En la Tabla 2 se describe el criterio tanto para binucleadas como para la valoración de los micronúcleos, esto fue determinado por HUMAN MicroNucleus Project.

**Tabla 2.** Criterios de Elección de Células y Micronúcleos determinados por la HUMN: Human MicroNucleus Project

Criterios para células Binucleadas	Criterios de Micronúcleos
<b>La membrana citoplasmática y nuclear y el citoplasma deben estar claramente distinguido e intactas</b>	El diámetro va de 1/3 y 1/16 de la media del diámetro del núcleo principal
<b>Núcleos con grado de condensación de cromatina similar, de igual forma, tamaño y patrón de tinción</b>	Deben presentar similar tinción a los núcleos principales y no ser refractarios
<b>Ninguno de los núcleos debe encontrarse en apoptosis.</b>	Los MNs no deben estar conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada
<b>Los núcleos se pueden presentar unidos por puentes nucleoplasmáticos pero no solapados unos con otros.</b>	Pueden tocar los núcleos de la célula pero no solaparse con ellos

Fuente: (Zalacain *et al.*, 2005).

Elaboracion: Autor

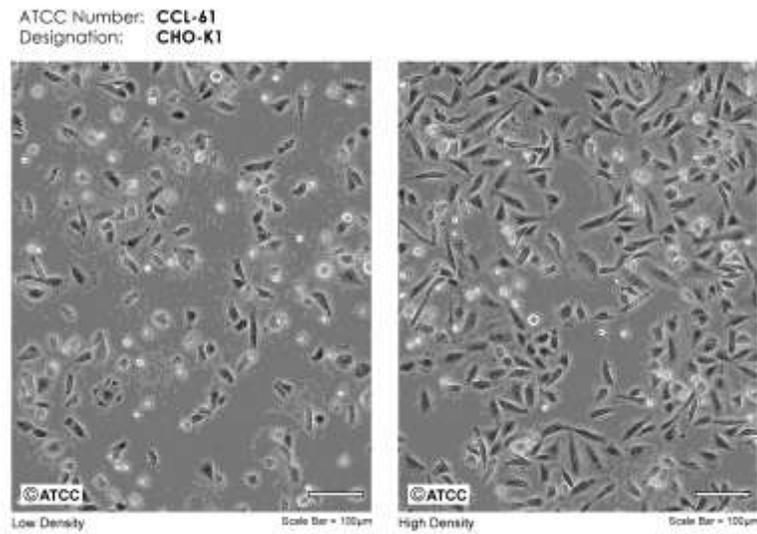
### 1.7. Cultivo Celular.

Se conoce como cultivo celular a la eliminación de células en un tejido de cualquier organismo, pueden obtenerse por disgregación (mecánicos o enzimáticos), después de obtener un subcultivo de una línea celular, las células que predominen en capacidad de crecimiento llegarán a uniformidad tanto genotípica como fenotípica (Gibco, 2015). Las condiciones de un cultivo dependen de cada tipo celular, sin embargo los factores que intervienen básicamente son: recipientes que contienen un sustrato al cual las células se adhieren (cultivo en monocapa), medio adecuado suplementado con nutrientes esenciales (factores de crecimiento, hormonas, gases, entre otros) y propiedades fisicoquímicas (pH, temperatura, macroambiente) (Freshney, 2010).

#### 1.7.1. Línea Celular Chinese Hamster Ovary CHO-K1.

En la Figura 2, se puede ver la morfología de las células denominadas CHO-K1 por la ATCC, son de origen epitelial obtenidos a partir de tejido de ovario del organismo *Cricetulus griseus*, hamster, Chinese (ATCC, 2016), los cultivos celulares de mamíferos han sido de gran importancia dentro de la investigación para determinar la mutagenicidad de productos con

potencial citotóxico es por ello que la línea celular CHO-K1 constituye uno de los materiales biológicos más valorados en genotoxicidad (Sánchez, 1999).



**Figura 2.** Estructura morfológica de células CHO-K1, algunas se presentan plegadas al sustrato y las que están en forma redondeada se encuentran en replicación.

**Fuente y elaboración:** (ATCC, 2016).

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

## 2.1. **Objetivo General.**

Evaluar la genotoxicidad o antigenotoxicidad de células CHO-K1 utilizando el análisis de micronúcleos que determinará el daño de la célula, tras exposición con los diferentes liofilizados de Horchata.

## 2.2. **Objetivos Específicos.**

Determinar el efecto genotóxico de la horchata en la línea celular CHO-K1 mediante el análisis de micronúcleos con tinción DAPI (diamidino-2-phenylindole dihydrochloride).

Determinar el efecto antigenotóxico de la horchata en la línea celular CHO-K1 mediante el análisis de micronúcleos con tinción DAPI (diamidino-2-phenylindole dihydrochloride).

Establecer si los liofilizados de horchata podrían actuar como agentes desmutágenos o bioantimutágenos en las células CHOK-1, mediante el análisis de micronúcleos con tinción DAPI (diamidino-2-phenylindole dihydrochloride).

### **CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3.1. **Obtención del material de Estudio.**

Para obtener el liofilizado de Horchata se hizo la recolección de las especies vegetales en los diferentes mercados de la ciudad de Loja como: el Mercado Mayorista, Centro Comercial y Feria libre Gran Colombia por parte de la Dra. Fani Tinitana, Docente de la Universidad Técnica Particular de Loja, mientras que la liofilización fue elaborada por parte del Dr. Juan Carlos Romero Benavides, Docente de la Sección de Química Básica y Aplicada, se pesaron las plantas en fresco para así obtener 1L de bebida, posteriormente se sometieron a ebullición por un periodo de 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se dispensó en frascos estériles sometidos a congelación con una inclinación de 45° y luego se pasó al liofilizador (LABCONCO-7754047) para obtener el extracto. Todo el extracto obtenido se trasvasó a un frasco de 100mL estéril y se dispensó en tubos eppendorf de 1.5 ml y se almacenó a 8°C. Se obtuvieron 9 tipos de Horchatas de las cuales 3 presentaron un efecto positivo en diferentes métodos de Biomarcadores de Genotoxicidad. La denominación que se les asignó según el número de liofilizado para horchata 2 (HRCH2), horchata 7 (HRCH7) y horchata 8 (HRCH8) y los porcentajes de la composición de las diferentes especies vegetales utilizadas en los preparados se muestran en el Anexo 1.

### 3.2. **Modelo Biológico y Cultivo Celular.**

La línea celular utilizada se deriva de ovario de hámster Chino (*Cricetulus griseus*) (CHO-K1 según ATCC, 2016), el medio de supervivencia celular es el HAMF-12 (GIBCO), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SIGMA), 1% de L-Glutamina (GIBCO) y 1% Antibiótico-Antimicótico (GIBCO). Las células se mantuvieron a una concentración de 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> con un tiempo de replicación de 24 horas.

### 3.3. **Ensayo de Micronúcleos.**

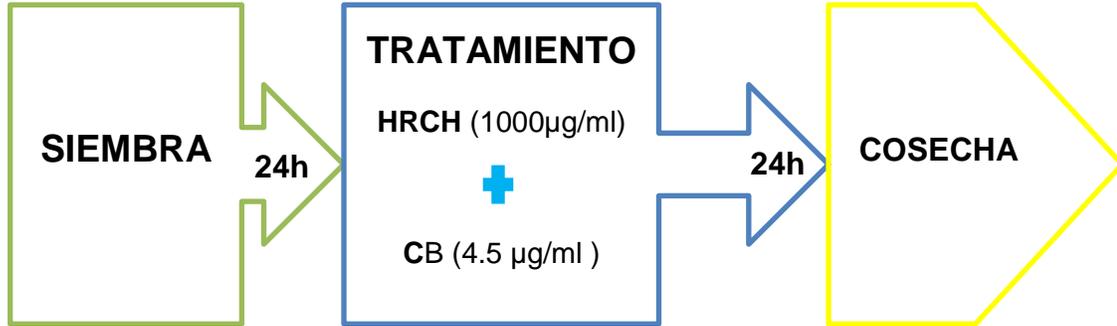
#### 3.3.1. **Siembra.**

En cajas de 6 pocillos, a los cuales se les introdujo un cubreobjetos previamente esterilizado, se sembró un número de 70.00 células y se incubó por 24 horas a 37°C atmósfera húmeda, 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 3.3.2. **Tratamientos.**

##### 3.3.2.1. **Determinación de Genotoxicidad de los liofilizados de Horchatas**

En la Figura 3 se puede evidenciar el procedimiento realizado para este experimento, así como los tiempos de exposición de los liofilizados de Horchata.



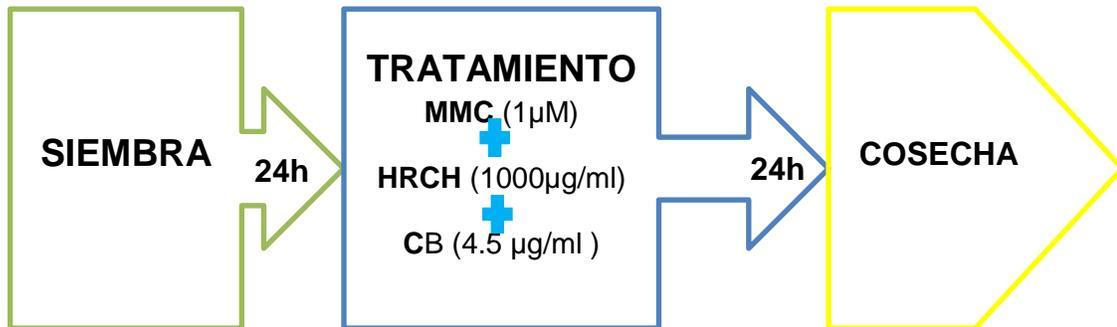
**Figura 3.** Esquema de la metodología utilizada en la Determinación de Genotoxicidad de los liofilizados de Horchata.

**Fuente y Elaboración:** Autor.

### 3.3.2.2. Evaluación de Antigenotoxicidad.

- **Determinación de Desmutagénesis: cotratamiento.**

En la Figura 4 se presenta el esquema usado como metodología cuando se aplicó las diferentes sustancias.

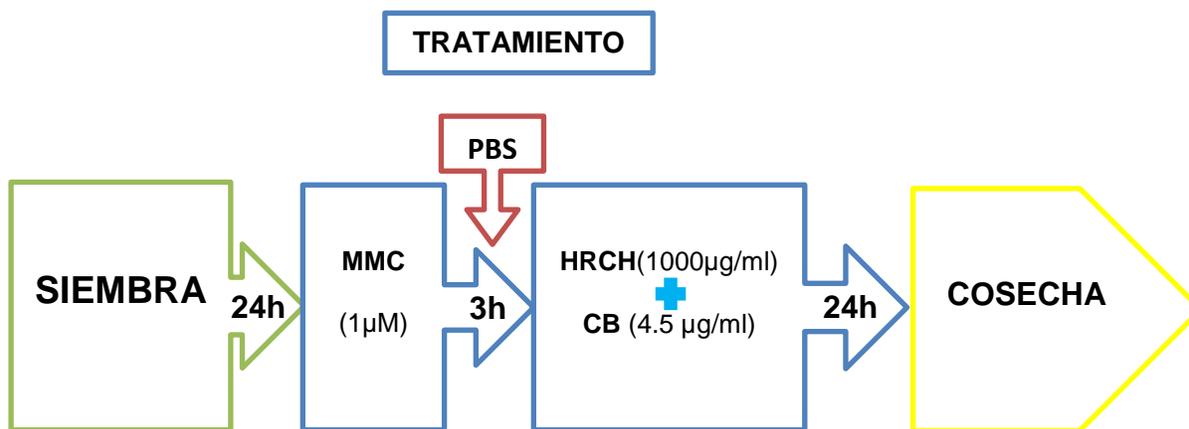


**Figura 4.** Esquema de la metodología utilizada en la Evaluación de Antigenotoxicidad, Determinación de Desmutagénesis: cotratamiento. MMC.

**Fuente y elaboración:** Autor.

- **Evaluación de Bioantimutagénesis: post tratamiento.**

El procedimiento que se realizó en cuanto a este ensayo, se indica en el esquema realizado en la Figura 5, donde se detalla el tiempo al que fueron colocados los extractos.



**Figura 5.** Esquema de la metodología utilizada en la Evaluación de Antigenotoxicidad, Evaluación de Bioantimutagénesis: post tratamiento.

**Fuente y elaboración:** Autor.

### 3.3.3. Cosecha.

Transcurrió el tiempo de incubación respectivo al tratamiento de cada ensayo, y a cada una de las cajas se las observó al microscopio, se eliminó el medio de cultivo, se adicionó medio más KCl (ALDRICH) a 0.075M y se incubó nuevamente en las mismas condiciones, durante 30 minutos; se descartó el sobrenadante y se añadió gota a gota 2 mL de Fijador de Carnoy (1:3 metanol (MERCK): ácido glacial acético (PHARMCO-AAPER)) con movimiento constante y circular por 10 minutos, este proceso se realizó dos veces.

### 3.3.4. Tinción DAPI.

Se retiró el sobrenadante y se colocó 2mL de PBS por 5 minutos, esto se repitió por 3 veces, luego se añadió 2mL de Tritón (PROMEGA) 0.1% por 15 minutos, transcurrido el tiempo nuevamente se realizó el lavado con PBS por 3 veces, luego se colocó 2mL de DAPI (1µg/mL) durante 10 minutos protegiendo de la luz, se hicieron los lavados respectivos con PBS y se colocó en un portaobjetos 20µL de solución Antifade, para sellar el cubreobjetos.

### 3.3.5. Criterios de Análisis de Micronúcleos.

Las placas realizadas se observaron en el microscopio Axioskop 2 plus (Zeiss, Alemania) que contaba con un iluminador de fluorescencia (lámpara HBO50) el conjunto específico para Tinción DAPI es el filtro con especificación de 365 nm de excitación y 420 nm de emisión y se analizaron también a contraste de fase para observar la membrana celular, y el análisis se realizó con un aumento de ~400x.

En base a Thomas et al., 2009, se tomó las observaciones detalladas en la Tabla 2 y el conteo fue manual sobre 2000 células para análisis de MNs y sobre 1000 células para el IDN (Zalacain et al., 2005; Thomas et al., 2009; Santamaría et al., 2012).

### **3.3.6. Análisis estadístico.**

Para analizar los ensayos y realizar las respectivas gráficas se utilizó el software estadístico GraphPad Prism versión, se empleó un test paramétrico Anova post test Dunnet y Bonferroni's Multiple Comparison Test.

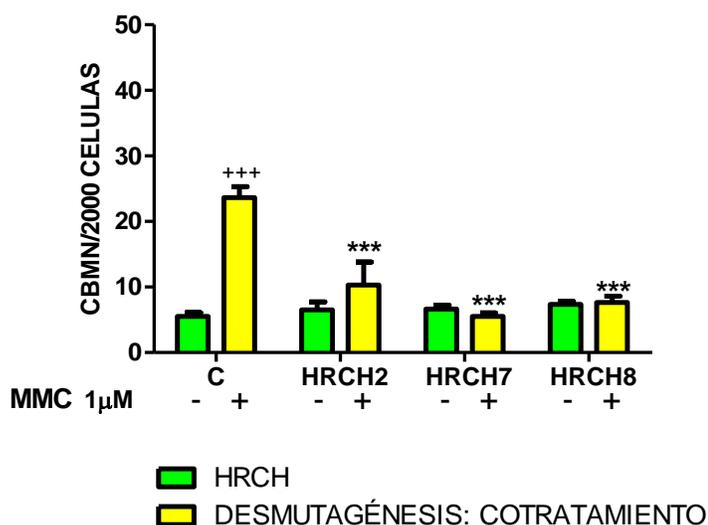
## **CAPITULO IV. RESULTADOS**

#### 4.1. Ensayo Micronúcleos.

##### 4.1.1. Determinación de Genotoxicidad de los liofilizados de Horchatas y Determinación de Desmutagénesis: cotratamiento.

En la Gráfica 1 se observa el número de células binucleadas con presencia de MNs, se utilizó medio suplementado HAM-F12 como control negativo, MMC (1 $\mu$ M) como control positivo, además de los liofilizados de las HRCHs (1000  $\mu$ g/mL). En el ensayo de genotoxicidad (barras de color verde) se evidencia que no existe un incremento en el número de MNs en las células tratadas con HRCHs con respecto al control negativo, determinando que no tienen un efecto genotóxico sobre las células CHO-K1.

Con respecto a la evaluación de antigenotoxicidad como agente desmutagénico, al tratar en conjunto con MMC (cotratamiento) y las HRCHs se observa en la Gráfica 1 como barras de color amarillo, que todos los liofilizados de HRCHs presentan un resultado significativo ( $p$ -value 0.0001) frente al control positivo, determinando que las HRCHs en las células CHO-K1 colocados en conjunto con MMC tienen un efecto desmutagénico.

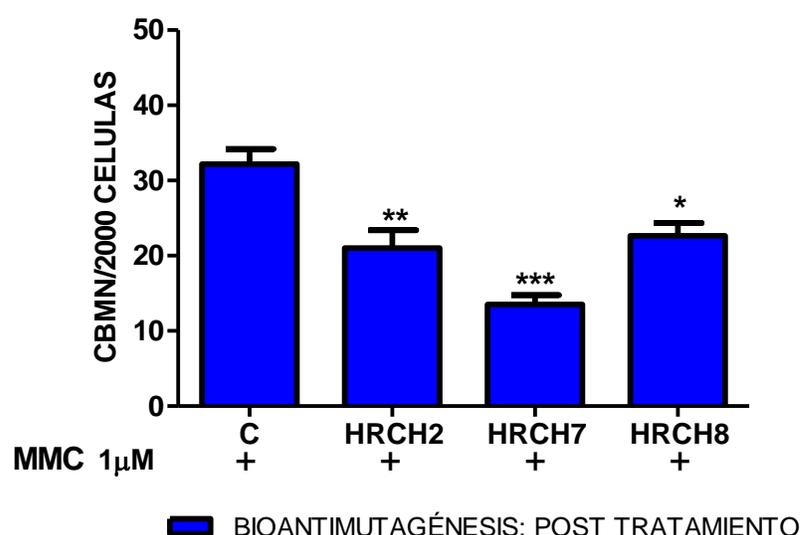


**Gráfica 1.** Número de células Binucleadas con Micronúcleos. Células CHO-K1 expuestas a dosis de 1000  $\mu$ g/mL y controles: negativo (Medio HAMF-12 Suplementado) y positivo MMC. Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se analizó mediante ANOVA- post test Dunnet (+++: $p$ <0.0001, ++:  $p$ <0.001, +: $p$ <0.01) frente al control negativo y Bonferroni's Multiple Comparison Test (Desmutagénesis: cotratamiento: \*\*\*: $p$ <0.0001, \*\*:  $p$ <0.001 \*: $p$ <0.01) frente al control positivo.

**Fuente y elaboración:** Autor.

#### 4.1.2. Evaluación de Bioantimutagénesis: post tratamiento.

Queriendo diferenciar entre el efecto desmutagénico y bioantimutagénico, realizamos un ensayo donde las horchatas fueron colocadas tres horas después de la MMC (post tratamiento) representado en la Gráfica 2 con barras de color azul, podemos observar que las tres HRCHs mantienen el efecto protector con respecto al control positivo ( $p$ -value 0.0001), sin embargo en la HRCH 7 se ve un efecto mayor ( $p$ -value 0.0001) con respecto a HRCH2 ( $p$ -value de 0.001) y la HRCH8 ( $p$ -value de 0.01).



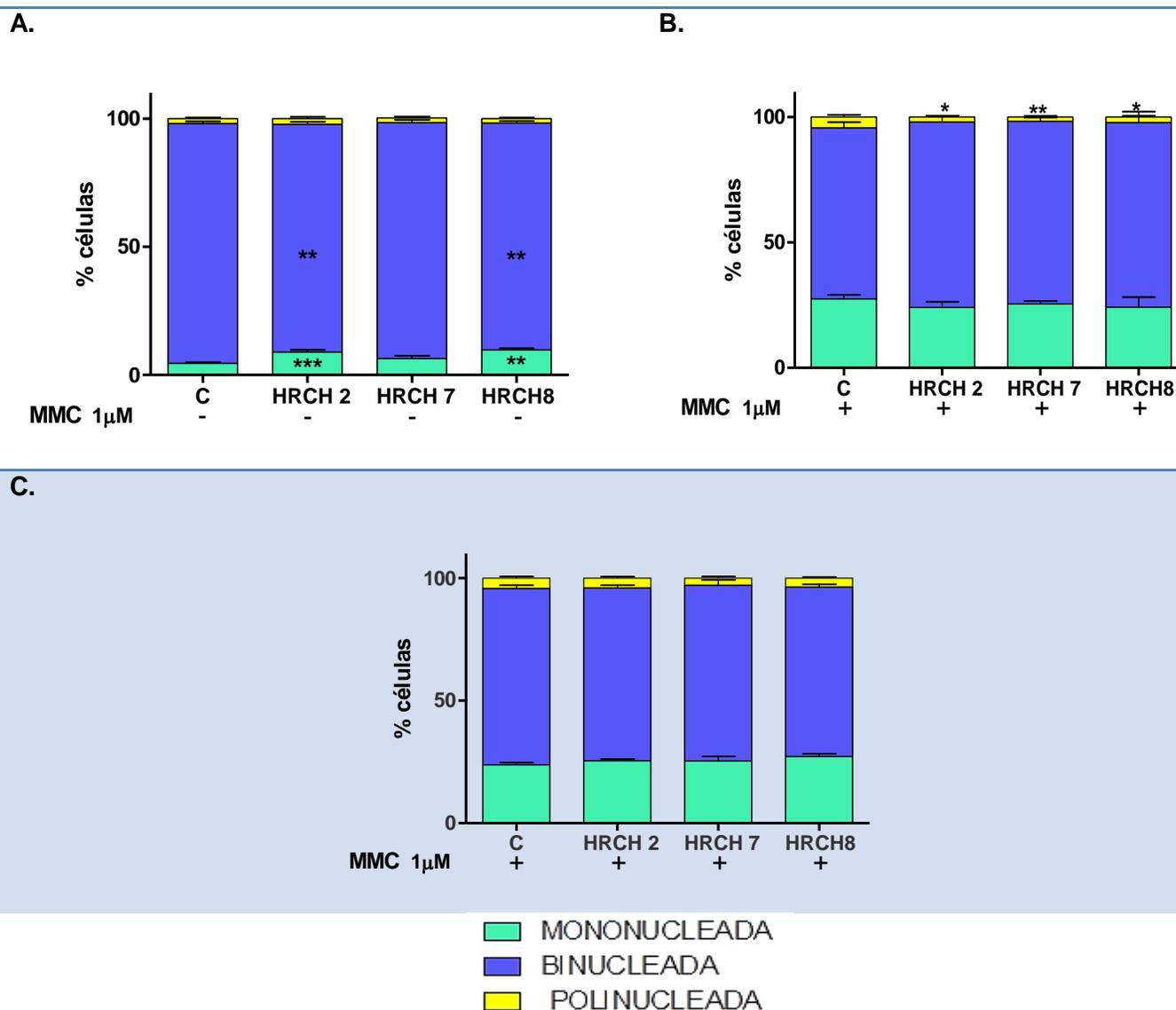
**Gráfica 2.** Número de células Binucleadas con Micronúcleos. Células CHO-K1 expuestas a dosis de 1000  $\mu$ g/mL y controles: negativo (Medio HAMF-12 Suplementado) y positivo MMC. Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se analizó mediante Bonferroni's Multiple Comparison Test para ambos ensayos (\*\*\*: $p$ <0.0001, \*\*:  $p$ <0.001 \*: $p$ <0.01) frente al control positivo.

**Fuente y elaboración:** Autor.

#### 4.2. Porcentaje de Células.

En la Gráfica 3A en el estudio genotóxico se puede evidenciar que en las células mononucleadas de HRCH2 ( $p$ -value 0.0001) y HRCH 8 ( $p$ -value 0.001) presentan una diferencia frente al control negativo, es decir que los liofilizados señalados tienen un cierto porcentaje de células que no han podido dividirse durante el periodo de detención del ciclo celular. En la Gráfica 3 B, todos los liofilizados muestran una disminución en cuanto a las células polinucleadas por lo que los extractos podrían estar disminuyendo la población de células viables, sin embargo, no existe una diferencia significativa en cuanto al porcentaje de

células binucleadas. En cuanto a la Gráfica 3C no existe diferencia significativa de los liofilizados frente al control determinando que no afectan a la proliferación celular.

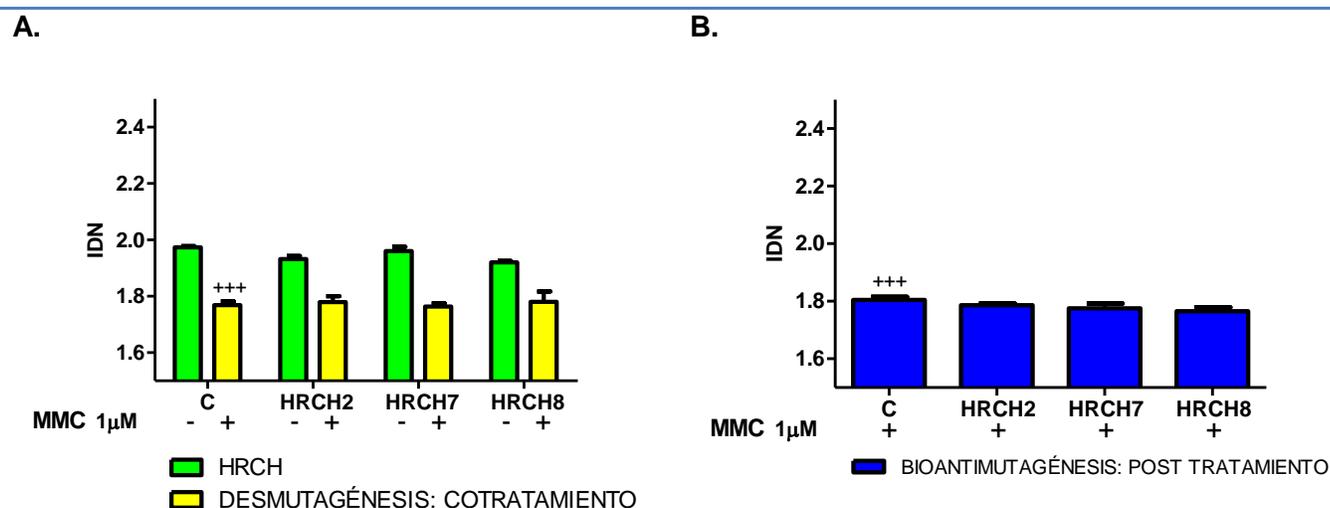


**Gráfica 3.** Porcentaje de células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas, analizadas en 1000 células. A. Determinación de Genotoxicidad de los liofilizados de Horchatas. Evaluación de Antigenotoxicidad B. Desmutagénesis: cotratamiento C. Bioantimutagénesis: post tratamiento. Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se analizó mediante ANOVA- post test Dunnet (\*\*\*: $p < 0.0001$ , \*\*:  $p < 0.001$ , \*:  $p < 0.01$ ) frente a los controles.

Fuente y elaboración: Autor.

#### 4.3. Índice de División Nuclear.

En la Gráfica 4 se observa el porcentaje de IDN, entre 1000 células evaluando células mononucleadas, binucleadas y polinucleadas, se utilizó los mismos controles y dosis del ensayo anterior. Los datos estadísticos del control positivo con respecto al negativo son estadísticamente significativos ( $p$ -value, 0.0001), lo que indica que la MMC disminuye la proliferación celular, siendo un compuesto citostático, sin embargo cuando aplicamos las HRCHs el efecto se mantiene sin existir diferencias significativas al exponer a las células a un post tratamiento.



**Gráfica 4.** Índice de División Nuclear. Ensayo elaborado bajo las mismas condiciones que el de evaluación de Micronúcleos. Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Se analizó mediante ANOVA- post test Dunnet (A. Genotoxicidad: +++:  $p < 0.0001$ , ++:  $p < 0.001$  +:  $p < 0.01$ ) frente al control negativo. Se analizó mediante Bonferroni's Multiple Comparison Test (A. Desmutagénesis: cotratamiento y B. Bioantimutagénesis: post tratamiento \*\*\*:  $p < 0.0001$ , \*\*:  $p < 0.001$  \*:  $p < 0.01$ ) frente al control positivo.

**Fuente y elaboración:** Autor.

## DISCUSIÓN

Considerando el uso tradicional que se le da a la horchata como bebida y el consumo paulatino de la misma dentro de nuestra comunidad, se cuestionó los posibles efectos en los seres humanos, es por ello que se evaluó 3 de los 9 liofilizados usados en estudios anteriores en donde se describe la capacidad de las HRCHs para causar inhibición del crecimiento celular e inducción de apoptosis en la línea celular de astrocitoma cerebral (Jaramillo-Velez, 2017). Además, los estudios realizados por Palacio-Arpi, 2016 determinaron actividad antígeno-tóxica de acuerdo con el ensayo cometa, además de la disminución de ROS (Palacios-Arpi, 2016).

El posible descubrimiento de nuevas moléculas con capacidad protectora, hoy en día podría ayudar a la quimioprevención evitando la aparición de enfermedades, llevando una dieta sana y equilibrada con un consumo adecuado de micronutrientes y antioxidantes (Arencibia *et al.*, 2009). La quimioprevención por fitoquímicos es un instrumento fácil de aplicar, con un enfoque aceptable y accesible para el control del cáncer; los fitoquímicos quimiopreventivos pueden bloquear o revertir la etapa pre maligna (iniciación y promoción) de la carcinogénesis en múltiples etapas (Surh, 2003).

En esta investigación se evaluó el índice de división nuclear tras la exposición de las HRCHs en células CHO-K1, no se observó que este parámetro se encuentre modificado comparando con el control negativo, afirmando que las horchatas no son citostáticas, es decir, no generan modificaciones en la proliferación de este modelo biológico. En cuanto a los ensayos de cotratamiento y post tratamiento en donde se utilizó MMC como control positivo, se observa notoriamente la disminución de la proliferación celular con respecto al control negativo, mientras que al adicionar las HRCHs estas tampoco influyen en el efecto de la MMC; a diferencia de estudios con carotenoides en donde se redujo el daño del ADN inducido por un agente mutágeno, pero el índice de división celular también disminuyó (Bhagavathy & Sumathi, 2012).

Mediante el análisis de micronúcleos los resultados de este proyecto determinaron que las horchatas probadas a 1000µg/ml durante 24 horas, no eran capaces de interactuar con el ADN y propiciar un daño genotóxico en el modelo biológico en estudio. Además, los liofilizados presentan propiedad antígeno-tóxica esta capacidad podría relacionarse con el alto contenido de plantas presentes en cada uno como: *Equisetum bogotense* Kunth, *Iresine herbstii* Hook, *Plantago major* L., *Mellisa officinalis*, *Cymbopogon citratus* Stapf, entre otras, las cuales poseen propiedades antimutagénicas y anticlastogénicas (Charehsaz, Sipahi, Giri, & Aydin, 2017).

Debido a que existen mecanismos de desmutagénesis o bioantimutagénesis se propuso dos modelos de estudio: cotratamiento y post tratamiento; para diferenciar el mecanismo de

protección, en el ensayo de desmutágenos (cotratamiento) resultó que todos los liofilizados presentaron un efecto inhibitor de genotoxicidad al colocarlo en conjunto con MMC. Las HRCHs fueron capaces de proteger el modelo celular significativamente (*p-value*, 0.0001) frente al control negativo, determinando que actúan como agentes bloqueadores con capacidad desmutagénica, reduciendo la frecuencia de mutaciones antes de llegar a la célula (Kuroda, Shankel, & Waters, 2012). La antigenotoxicidad en este caso, como en otros estudios, podría estar principalmente mediada por la competencia del mutágeno con el agente antigenotóxico (Elibio *et al.*, 2017), ya sea que comience la interacción en el medio extracelular y proceder después de su encuentro en el medio intracelular, resultando en una menor biodisponibilidad del agente mutágeno (Oliviera *et al.*, 2007). Bioquímicamente la inhibición de los compuestos mutágenos se puede dar mediante restricción de ciertas enzimas por modulación de estas, en fase I y II (Mazzaron, Shimabukuro, Prates, Medeiros, & De Syllos, 2007) o impidiendo la unión mutagénica al ADN y eliminando ROS, (Nikolić, Mitić-čulafić, Vukovic, & Knežević, 2012).

En cuanto al ensayo post tratamiento propuesto, consiste en observar si las horchatas son capaces de reparar el ADN o activar vías de muerte celular tras tener un daño genotóxico; los resultados obtenidos en el modelo post tratamiento resultaron que la HRCH7 también podría actuar mediante este mecanismo, mientras que HRCH2 y HRCH8 lo hacían en menor proporción. Deduciendo que se produce este efecto por el mecanismo de bioantimutagénesis actuando sobre mecanismos fisiológicos de protección del ADN, revertiendo los efectos mutágenos e impidiendo mutaciones de *ново* (Mazzaron *et al.*, 2007). Existen varios ejemplos de compuestos naturales obtenidas a partir de especies vegetales (*Origanum compactum*, *Artemisia herba alba*, *Cinnamomum camphora* y *Salvia officinalis*), que actúan mediante el incremento de la efectividad de los mecanismos de reparación del ADN (Fuentes *et al.*, 2017), potenciando la compensación de apareamientos erróneos, la fidelidad de la ADN polimerasa en la replicación o en la reparación por síntesis y el aumento de la reversión del daño, son formas de acción propuestas para extractos de plantas con actividad antioxidante (Nichols & Katiyar, 2010). Debido a que la actividad de MMC está asociada con su capacidad para alquilar el ADN y producir radicales libres reactivos (Lemes *et al.*, 2017) se podría señalar que el mecanismo de acción de las HRCHs ocurre mediante la reducción de la alquilación por la acción antioxidante ejercida por las especies vegetales. Además, existen otras vías de reparación del ADN, como BER y la reparación de recombinación que desempeñan un papel importante en este tipo de estudios con actividad protectora (Vernhes *et al.*, 2016).

Por la presencia de gran variedad de plantas en las mezclas de las diferentes HRCHs, es difícil poder señalar con certeza qué compuestos o si el conjunto de ellos serían los responsables de esta actividad, así como menciona Lemes *et al.*, 2017, que los efectos antígenotóxicos serían el resultado de un sinergismo de todas las moléculas o sólo reflejarían las principales moléculas presentes en niveles altos (Lemes *et al.*, 2017). Los liofilizados se diferencian en especies y en la proporción de cada planta, de acuerdo con el Anexo 1, las especies presentes en las tres HRCHs son: *Equisetum bogotense* Kunth, que según estudios tiene un efecto citoprotector o hepatoprotector contra el estrés químico y oxidativo (Shah *et al.*, 2011); *Iresine herbstii* Hook, cuya estructura morfológica utilizada como anticancerígena y cicatrización de heridas son sus hojas, que contiene compuestos fenólicos con actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antiviral y anticancerígena (Chaudhuri & Sevanan, 2012; Nweze, Nwachukwu, & Adieme, 2016); *Plantago major* L., contiene baicaleína que induce la muerte de células de carcinoma de colon, además posee hispidulina y plantaginina con actividad antioxidante (Ozaslan *et al.*, 2007; Samuelsen, 2000). Entre las plantas presentes en HRCH 2 y HRCH 8 tenemos a *Mellisa officinalis*, de la cual ha sido aislado ácido rosmarínico, capaz de disminuir la frecuencia de micronúcleos y del daño del ADN inducido por doxorubicina; además, por la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los extractos de esta planta se verificó una posible relación con la actividad antioxidante, sin embargo, Cassettari *et al.*, 2011 determinó que era ineficaz en extracto acuoso obtenido a partir de la infusión (Cassettari *et al.*, 2011). Dentro de las especies con actividad protectora presentes en HRCH 7 y HRCH8 se encuentra *Cymbopogon citratus* Stapf, que contiene varios fitoconstituyentes como flavonoides y compuestos fenólicos, terpenoides y aceites esenciales, responsables de las diferentes actividades biológicas, una de ellas es ser antimutagénico (Shah *et al.*, 2011), incluso Vinitketkumnun, *et al.*, 1994 señala que podría utilizarse como quimiopreventivo debido a lo observado en sus ensayos en donde inhibe mutagenicidad de Mitomicina C y disminuye la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los cultivos de células CHO-K1 tratadas previamente (Capiro, Sanchez-Lamar, Fonseca, Baluja, & Borges, 2001). Fuentes *et al.*, 2017 proponen que la vía de acción protectora de *C. citratus* Stapf es bioantimutagénica (Fuentes *et al.*, 2017), interviniendo en la alquilación del ADN por la vía de reparación de la escisión de base y además, no presentan efectos genotóxicos en las células (Vernhes *et al.*, 2016). Solo en la mezcla de la HRCH7 se encuentran estas especies de plantas que podrían aumentar esta capacidad protectora, entre ellas tenemos a la especie *Dianthus caryophyllus* L., cuya actividad antioxidante se debe al compuesto eugenol, reportada en diferentes estudios (El-Ghorab, Mahgoub, & Bekheta, 2006;

Oktay, Gülçin, & Küfrevioğlu, 2003); en la especie *Malva parviflora* L., ha sido probada su capacidad antioxidante mediante reducción de efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transformándolo en agua, lo que puede atribuirse a sus compuestos fenólicos, que donan un electrón a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Farhan *et al.*, 2012).

Determinado por estudios previos mediante tamizaje fitoquímico, los metabolitos secundarios presentes en la HRCH2 fueron terpenoides, flavonoides, saponinas y quinonas, mientras que en la HRCH7 y HRCH8 están presentes alcaloides, terpenoides, flavonoides y saponinas, pero adicionalmente la HRCH8 también contiene taninos. Entre los productos naturales de las plantas que presentan efecto antimutagénico según la bibliografía, se describe los compuestos terpenoides (carotenoides) (Elibio *et al.*, 2017), alcaloides, compuestos fenólicos (flavonoides) (Arencibia *et al.*, 2009), vitaminas y minerales (Gonçalves, Lemos, Niero, Andrade, & Maistro, 2012). En cuanto a mecanismos de reparación, Elibio *et al.*, 2017 señalan que después de aplicar el agente alquilante, los carotenoides influenciaron en la cinética de reparación del ADN (Elibio *et al.*, 2017) por lo que se podría creer que los carotenoides estén involucrados en esta respuesta antimutagénica; de la misma manera la presencia de isoflavonas permiten reducir el daño del ADN (disminuyendo el contenido de nitrato, nitrito y nitrotirosina), posiblemente a través de estrés oxidativo asociándolo con su actividad aumentada de enzimas antioxidantes (Furtado, Pinheiro, Pereira, Gomes, & Ferreira, 2014). Asimismo, los compuestos fenólicos promueven la protección de componentes celulares contra el daño inducido por radicales libres, mediante sus efectos de barrido (Bacanli, Başaran, & Başaran, 2015), e incluso algunos polifenoles como teaflavina y tearubiginas inhiben la activación de carcinógenos indirectos extracelularmente (Charehsaz *et al.*, 2017).

Finalmente, los resultados de esta investigación corroboran el estudio llevado a cabo por Jaramillo-Velez, 2017 en donde este tipo de hallazgos pueden generar nuevos tratamientos en el cáncer debido a que estas sustancias protegen las células normales del daño causado en el ADN (medido por test de Micronúcleos y Ensayo Cometa) y son específicos para líneas celulares tumorales (Jaramillo-Velez, 2017; Palacios-Arpi, 2016). Sin embargo, por la presencia de diferentes compuestos sería necesario continuar con una investigación enfocada en aislar los compuestos específicos, responsables de la capacidad desmutágena o bioantimutágena o si se trata de un sinergismo entre ellos lo que le da la capacidad antigenotóxica potenciada.

## CONCLUSIONES

Las horchatas de este estudio fueron HRCH2, HRCH7 y HRCH8 que a dosis de 1000µg/ml todas presentaron un efecto protector y desmutágenas, mientras que como bioantimutágena la HRCH7 fue la más eficaz que HRCH2 y HRCH8 en menor proporción.

La capacidad antigenotóxica no está asociada a la modulación de la proliferación celular, dado a que ninguna de las horchatas probadas genera un efecto citostático.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alarcón, J. (2011). Plantas aromáticas y medicinales Enfermedades de importancia y sus usos terapéuticos. (pp. 1–48).
- Alborghetti, G., Casanova, M., De Olivera, G., Laís, F., Pereira, F., Salvador, N., & Gatti, P. (2015). Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. *Elsevier*, 65(1), 21–26. <http://doi.org/10.1016/j.bjanes.2013.07.008>
- Álvarez, C., Arellano, F., & Pérez, A. (2015). Técnicas de Estudio para la Evaluación del daño al ADN y su aplicación en la producción animal. *Senasa*, 7, 21–37.
- Arango, S. (2012). Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana. *Rev. Fac. Nac. Salud Publica.*, 30, 75–82.
- Arencibia, D., Rosario, L., López, Y., & Díaz, D. (2009). Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos. *Rev de Toxicologia En Linea RETEL*, 37–51.
- ATCC. (2016). *CHO-K1 (ATCC ® CCL-61™)*. Retrieved from <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-61.aspx>
- Avello, M., & Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Rev Med Chile Scielo*, 1288–1293.
- Bacanli, M., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2015). The antioxidant and antigenotoxic properties of citrus phenolics limonene and naringin. *Elsevier, Food and Chemical Toxicology*, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.015>
- Bailon, N., Romero, J. C., Tinitana, F., & Ostrosky, P. (2015). Medicinal plants of Ecuador: A review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Medicinal Chemistry Research*, 1–14. <http://doi.org/10.1007/s00044-015-1335-7>
- Barcelos, G. R. M., Shimabukuro, F., Maciel, M. A. M., & Cólus, I. M. S. (2007). Genotoxicity and antigenotoxicity of cashew (*Anacardium occidentale* L.) in V79 cells. *Toxicology in Vitro*, 21(8), 1468–1475. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.006>
- Bellini, M. F., Angeli, J. P. F., Matuo, R., Terezan, A. P., Ribeiro, L. R., & Mantovani, M. S. (2006). Antigenotoxicity of *Agaricus blazei* mushroom organic and aqueous extracts in chromosomal aberration and cytokinesis block micronucleus assays in CHO-k1 and HTC cells. *Toxicology in Vitro*, 20(3), 355–360. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.009>
- Bhagavathy, S., & Sumathi, P. (2012). Evaluation of antigenotoxic effects of carotenoids from green algae *Chlorococcum humicola* using human lymphocytes. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 109–117. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60203-7](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60203-7)

- Brugés, K., & Reguero, M. (2007). Evaluación preliminar de toxicidad , genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L . *Rev. Colomb. Biotecnol*, IX(Julio), 5–14.
- Bussmann, R., & Sharon, D. (2015). *Plantas Medicinales de los Andes y la Amazonia - La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú*. Trujillo, Peru. <http://doi.org/10.13140/RG.2.1.3485.0962>
- Cao, J., Jiang, L. P., Liu, Y., Yang, G., Yao, X. F., & Zhong, L. F. (2007). Curcumin-induced genotoxicity and antigenotoxicity in HepG2 cells. *Toxicol*, 49(8), 1219–1222. <http://doi.org/10.1016/j.toxicol.2007.02.006>
- Capiro, N., Sanchez-Lamar, A., Fonseca, G., Baluja, L., & Borges, E. (2001). Capacidad protectora de *cymbopogon citratus* (dc.) stapf. ante el daño genético inducido por estrés oxidativo. *SciELO*, 20(1), 33–37.
- Carballo, A., Cortada, C., & Gadano, A. (2005). Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria*, 14(ISSN 0717-196X), 95–98.
- Carrión, V. (2012). El Etnoecosistema en la producción de las plantas medicinales en la comunidad “ El Carmelo”. Universidad Internacional de Andalucía.
- Cassettari, N., Fryberg, M., Dimer, D., Moreira, J., Nicolau, V., De Aguiar, P., ... Moraes, V. (2011). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. *Genetics and Molecular Biology*, (April), 290–297. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572011000200021>
- Cerón, C. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 285–293.
- Charehsaz, M., Sipahi, H., Giri, A. K., & Aydin, A. (2017). Antimutagenic and anticlastogenic effects of Turkish Black Tea on TA98 and TA100 strains of *Salmonella typhimurium* ( in vitro ) and mice ( in vivo ). *Pharmaceutical Biology*, 0(0), 000. <http://doi.org/10.1080/13880209.2017.1282969>
- Chaudhuri, D., & Sevanan, M. (2012). Investigation on phytochemicals and antibacterial activity of the leaf and stem extracts of *Iresine Herbistii*. *International Journal of Pharma and Bio Sciences ISSN*, 3(4), 697–705.
- De Oliveira, J. T., Barbosa da Silva, M. C., de Camargos, L. F., Gomes da Silva, I. V., de Pila Varotti, F., da Silva, L. M., ... dos Santos, F. V. (2017). Digoxin reduces the mutagenic effects of Mitomycin C in human and rodent cell lines. *Cytotechnology*. <http://doi.org/10.1007/s10616-017-0078-3>
- El-Ghorab, A., Mahgoub, M., & Bekheta, M. (2006). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*

- Effect of Some Bioregulators on the Chemical Composition of Essential Oil and its Antioxidant Activity of Egyptian Carnation ( *Dianthus caryophyllus* L .). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 3(July 2013), 37–41. <http://doi.org/10.1080/0972060X.2006.10643494>
- Elibio, G., Paganini Damiani, A., Daminelli Borges, G., Oliveira Teixeira, K., Martins Jesus, M., Daumann, F., ... Moraes De Andrade, V. (2017). Effect of green juice and their bioactive compounds on genotoxicity induced by alkylating agents in mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 0(0), 1–11. <http://doi.org/10.1080/15287394.2017.1357307>
- Farhan, H., Rammal, H., Hijazi, A., Hamad, H., Daher, A., Reda, M., & Badram, B. (2012). In vitro Antioxidant Activity. *Academic Science*, 5(2000), 2–6.
- Fernández, G., & Viracucha, C. (2014). “Guía de bebidas típicas representativas de la sierra centro y sur Ecuatoriana y su maridaje con platos típicos de esta zona” (p. 60). Universidad.
- Freshney, R. I. (2010). *Culture of animal Cells. A manual of basic Technique and Specialized Application*. (Wiley Jhon & Sons, Ed.) (6th Editio). Canada. Retrieved from <http://es.slideshare.net/hugolival90/culture-of-animal-cells-6th-freshney>
- Fuentes, F., García, F., Roque, K., da Silva, R., Martins, F., & Sánchez, Á. (2017). Fotoprotección del DNA ejercida por fracciones obtenidas de *Cymbopogon citratus* ( Poaceae ) DNA photoprotection exerted by chemical fractions obtained from. *Rev Cubana Invest Biomed*, 5(Dc), 1–9.
- Furtado, L., Pinheiro, L., Pereira, R., Gomes, P., & Ferreira, S. (2014). Soy isoflavones have antimutagenic activity on DNA damage induced by the antileishmanial Glucantime (meglumine antimoniate). *Healthcare*, 1–6. <http://doi.org/10.3109/01480545.2014.963599>
- Garzon, L. P. (2016). Conocimiento tradicional sobre las plantas medicinales de yarumo (*Cecropia sciadophylla*), Carambolo (*Averrhoa carambola*) y uña de gato (*Uncaria tomentosa*) en el resguardo indígena de Mcedonia, Amazonas. *Luna Azul*, (43), 386–414. <http://doi.org/10.17151/luaz.2016.43.17>
- Gibco. (2015). *Cell Culture Basics Handbook*. Thermo Fisher Cientific. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/promotions/global/images/aai-2015/aai-pdfs/GibcoCellCultureBasicsHandbook.pdf>
- Gonçalves, Á. L., Lemos, M., Niero, R., Andrade, S. F. De, & Maistro, E. L. (2012). Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice. *J Ethnopharmacol*, 740–745.

<http://doi.org/doi:10.1016/j.jep.2012.07.044>.

- Hoshina, M. M., & Marin-Morales, M. A. (2014). Anti-genotoxicity and anti-mutagenicity of *Apis mellifera* venom. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 762, 43–48. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.11.005>
- Jacociunas, L. V., De Andrade, H. H. R., Lehmann, M., Pedersini, L. W., Ferraz, A. D. B. F., Da Silva, J., & Dihl, R. R. (2013). Protective activity of *Cynara scolymus* L. leaf extract against chemically induced complex genomic alterations in CHO cells. *Phytomedicine*, 20(12), 1131–1134. <http://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.06.003>
- Jaramillo-Velez, A. (2017). *Actividad citotóxica y mecanismos de muerte celular de distintas horchatas expendidas en los principales mercados de la ciudad de Loja*. Universidad Tecnica Particular de Loja.
- Kuroda, Y., Shankel, D., & Waters, M. (2012). *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanisms II*. New York: Springer Science & Business.
- Lemes, S. R., Chaves, D. A., Da Silva, N. J., Carneiro, C. C., Chen- Chen, L., De Almeida, L., ... De Melo, P. (2017). Antigenotoxicity protection of *Carapa guianensis* oil against mitomycin C and cyclophosphamide in mouse bone marrow. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 1–9. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720150797>
- Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*. *NCBI*, 4, 131. Retrieved from <http://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131>
- Marcillo, E., & Naranjo, D. (2012). *“Diseño de la Línea de Producción de una Bebida de Hierbas Denominada Horchata.”* Guayaquil, Ecuador.: Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Mazzaron, G. R., Shimabukuro, F., Prates, M., Medeiros, M., & De Syllos, I. (2007). Evaluation of mutagenicity and antimutagenicity of cashew stem bark methanolic extract in vitro. *Elsevier*, 114, 268–273. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.006>
- Meschini, R., Berni, A., Filippi, S., Pepe, G., Grossi, M. R., Natarajan, A. T., & Palitti, F. (2015). The micronucleus assay in mammalian cells in vitro to assess health benefits of various phytochemicals. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 793, 79–85. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.06.016>
- Mohammed, S., Sisodia, S. S., Mansori, A. N., & Dheeraj, R. (2014). “ Genotoxicity : In Vivo Cytogenetic Assays .” *International Journal of Pharmamedix India*, 2(July), 792–803.
- Nichols, J. A., & Katiyar, S. K. (2010). Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory , antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch Dermatol Res*, 71–83.

<http://doi.org/10.1007/s00403-009-1001-3>

- Nigro, L., Marcela, M., & Marta, A. (2009). Biomarkers for evaluation of potencial genotoxicity. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe de Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 8(2), 154–159.
- Nikolić, B., Mitić-ćulafić, D., Vukovic, B., & Knežević, J. (2012). Molecular Mechanisms of Action of Antimutagens from Sage ( *Salvia officinalis* ) and Basil ( *Ocimum basilicum* ). *INTECH*, 5, 86–112.
- Nweze, N. E., Nwachukwu, K. A., & Adieme, I. C. (2016). The effect of Iresine herbstii Hook on some haematological parameters of experimentally induced anaemic rats. *Comparative Clinical Pathology*. <http://doi.org/10.1007/s00580-016-2266-5>
- Oktay, M., Gülçin, I., & Küfrevioğlu, I. (2003). Determination of in vitro antioxidant activity of fennel ( *Foeniculum vulgare* ) seed extracts. *Elsevier*, 36, 263–271. [http://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00226-8](http://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00226-8)
- Oliveira, R. J., Matuo, R., da Silva, A. F., Matiazi, H. J., Mantovani, M. S., & Ribeiro, L. R. (2007). Protective effect of -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicology in Vitro*, 21(1), 41–52. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.07.018>
- Oliviera, R., Matuo, R., Da Silva, F., Matiaza, H., Mantovani, S., & Ribeiro, L. (2007). Protective e V ect of -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* , against DNA damage and cytotoxicity in wild-type ( k1 ) and repair-de W cient ( xrs5 ) CHO cells. *Elsevier*, 21, 41–52. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2006.07.018>
- Organización Mundial de la Salud. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. *Catalogación Por La Biblioteca de La OMS*, (ISBN 978 92 4 350609 8), 15–17.
- Ozaslan, M., Karagöz, D., Kalender, M. E., Kilic, I., Sari, I., & Karagöz, A. (2007). In vivo Antitumoral Effect of *Plantago major* L . Extract on Balb / C Mouse with Ehrlich Ascites Tumor. *The American Journal of Chinese Medicine*, 35(5), 841–851.
- Palacios-Arpi, A. (2016). *Actividad anti-genotóxica mediante ensayo cometa de la horchata expandida en los mercados de Loja*. Universidad Tecnica Particular de Loja.
- Poersch, A., Santos, F. V. dos, Maciel, M. A. M., Câmara, J. K. P. da, Dantas, T. N. de C., & Cólus, I. M. de S. (2007). Protective effect of DCTN (trans-dehydrocrotonin) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents in vitro. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 629(1), 14–23. <http://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.01.001>

- Rashid, S. (2017). Classification of Chemopreventive Agents, 57–63. <http://doi.org/10.1007/978-981-10-2579-2>
- Remigio, A., Vega, Y., Piloto, J., & Rodríguez, J. (2008). Genotoxicidad de Justicia pectoralis Jacq. (tilo). *Centro de Investigación Y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), La Habana, Cuba*. Retrieved from [http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13\\_2\\_08/pla04208.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13_2_08/pla04208.htm)
- Rios, M. (2008). *Conocimiento Tradicional Y Plantas Utiles Del Ecuador: Saberes Y Practicas*. Retrieved from [https://books.google.es/books?id=HZU\\_zQ0H3jMC&dq=MEDICINA+TRADICIONAL+EN+ecuador&lr=&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.es/books?id=HZU_zQ0H3jMC&dq=MEDICINA+TRADICIONAL+EN+ecuador&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- Rios, 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*, 1–20. <http://doi.org/10.1186/s13002-017-0145-z>
- Roberto, M. M., Matsumoto, S. T., Jamal, C. M., Malaspina, O., & Marin-Morales, M. A. (2016). Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and Baccharis dracunculifolia, by in vitro study with HTC cells. *Toxicology in Vitro*, 33, 9–15. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.005>
- Samuelson, A. B. (2000). The traditional uses , chemical constituents and biological activities of Plantago major L . A review. *Elsevier*, 71, 1–21.
- Sánchez. (1999). Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Rev Cubana Invest Biomed*, 18(1), 19–21.
- Sánchez, Á., Fonseca, G., Capiro, N., & Fernández, D. (2000). Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Scielo*, 34. Retrieved from [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152000000100005](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000100005)
- Santamaría, W., Mora, C., Escobar, P., Cruz, P., & Velasco, Y. (2012). Inducción de micronúcleos y otras anomalías nucleares en Astyanax gr . bimaculatus ( Pisces : Characidae ) expuestas a fenantreno. *Scielo*, 16(Noviembre 29), 237–247.
- Scolastici, C., Alves de Lima, R. O., Barbisan, L. F., Ferreira, A. L. A., Ribeiro, D. A., & Salvadori, D. M. F. (2008). Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicology in Vitro*, 22(2), 510–514. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.11.002>
- Scovassi, I., & Guamán, L. M. (2013). Biochemistry & Pharmacology : Open Access Traditional Medicine : An Ancient Remedy Rediscovered, 2(1), 2–4. <http://doi.org/10.4172/2167-0501.1000110>

- Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., & Mann, A. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Avanced Farmaceutical Technology & Research*, 2, 3–8. <http://doi.org/10.4103/2231-4040.79796>
- Simic, D., Vukovic-Gacic, B., Knezevic-Vukcevic, J., Trininic, S., & Jankov, R. (1997). Antimutagenic effect of terpenoids from sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 16, 293–301. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=2173223>
- Surh, Y. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature*, 3(October), 768–780. <http://doi.org/10.1038/nrc1189>
- Tene, V., Malagon, O., Finzi, P., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *J Ethnopharmacol*, 111, 63–81.
- Thomas, P., Holland, N., Bolognesi, C., Kirsch-volders, M., Bonassi, S., Zeiger, E., ... Fenech, M. (2009). Buccal micronucleus cytome assay. *Nature*, 4(6), 825–837. <http://doi.org/10.1038/nprot.2009.53>
- Tinitana, F. (2014). “Composición florística y etnobotánica de las diferentes formaciones vegetales de la provincia de Loja, Ecuador.” Universidad Politécnica de Madrid.
- Torres, O., Zavala, M., Macriz, N., Flores, A., & Ramos, M. (2013). Procedimientos básicos de la prueba de micronúcleos y anormalidades nucleares en células exfoliadas de mucosa oral. *M*, 8, 4–11.
- Tsung-yun, L., Li-kang, H., Yu Chuen, T., & Su- Hua, C. (1996). Modification of mitomycin C-induced clastogenicity by *Terminalia Catappa* L. in vitro and in vivo, 105.
- Umang, S. (2012). Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals: *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(2 de May-June), 43–54.
- Vernhes, M., Gonzalez, M., Fuentes-León, F., Baly, L., Menck, C., & Sánchez-lamar, A. (2016). Desmutagenic activity of *Cymbopogon citratus* and *Phyllanthus orbicularis* against UVC damage in *E. coli*. *Advance Pharmaceutical Journal*, (December), 80–85.
- Vizoso, A., García, A., & Ramos, A. (1999). Ausencia de potencial Genotóxico in vitro e in vivo de un extracto fluido de *Piper Auritum* H.K.B. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 3, 51–89. Retrieved from <file:///C:/Users/Usuario/Desktop/MARCO TEORICO/MICRONUCLEOS/vizozo.pdf>
- Zalacain, M., Sierrasesúмага, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Scielo*, 28(Mayo-Agosto),

227-236.

## **ANEXOS**

**Anexo 1.** Plantas utilizadas en la mezcla de los liofilizados investigados, propuestos según su estructura morfológica, lugar de recolección, proporción, y propiedades medicinales.

Familia	Especie	Estructura morfológica	Nombre común	Mercado Mayorista	Centro Comercial	Feria Libre Gran Colombia	Propiedades medicinales
				HRCH			
				7	2	8	
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Inflorescencia	Ataco		5.3	11.1	Anti-inflamatorio, diurético, emenagogo, tónico, vulnerario
Verbenaceae	<i>Aloysia triphylla</i> (L'Her.) Britton	Ramas	Cedrón		5.7	1.4	
Boraginaceae	<i>Borago officinalis</i> L.	Hojas	Borraja			5.9	Analgésico, antidiarreico, antigripal, anti-inflamatorio, antitusivo, emenagogo, febrífugo
Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf	Hojas	Hierba Luisa	7.3		9.9	Analgésico, cardiotónico, digestivo, diurético, hipertensiva, sedante, dolor de estómago
Cariophyllaceae	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Planta	Clavel	0.3			Analgésico, anti-inflamatorio, cardiotónico, restaurativa, sedante
Equisetaceae	<i>Equisetum bogotense</i> Kunth	Tallo y hojas	Cola de caballo	1.2	5.9	0.9	Anti-inflamatorio, antiséptico, diurético, febrífugo, hepática, hipotensor
Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Hojas	Hinojo	6.4	4.4		Analgésico, carminativo, digestivo, diurético, hepático, dolor de estómago, tónico

Onagraceae	<i>Fuchsia magellanica</i> Lam.	Flor	Pena pena blanca morada simple	1.2	1.7		Diurético sedante
	<i>Fuchsia hypoleuca</i> Hort.	Flor	Pena pena blanca rosada	1.9	4.4		Diurético
Amaranthaceae	<i>Iresine herbstii</i> Hook.	Hojas	Escancel	11.3	11.2	23.1	Analgésico, antigripal, antiinflamatorio, diurético, hepática, tónico
Malvaceae	<i>Lavatera arborea</i> L.	Corteza y hojas	Malva blanca grande		12.5	9.1	Anti-inflamatorio, cáncer
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Semilla	Linaza	7.3	3.3		Diurético, anti-inflamatorio
Malvaceae	<i>Malva parviflora</i> L.	Corteza, hojas, flor y ramas	Malva coche rosada	16.6			Heridas, anti-inflamatorio
Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i> L.	Planta	Manzanilla			0.8	Analgésico, antidiarreico, anti-inflamatorio, carminativo, digestivo, sedante, dolor de estómago
Brassicaceae	<i>Matthiola incana</i> (L.) R. Br.	Flor	Alhelí	3.5			Diurético, espectorante, estomacal, estimulante
	<i>Melissa officinalis</i> L.	Hojas	Toronjil		12.2	0.8	Analgésico, antiinflamatorio, antiespasmódico, cardiotónico, digestivo, sedante
	<i>Mentha spicata</i> L.	Hojas	Menta,			0.6	Analgésico, anti-inflamatorio, antigripal,

			hierba buena (pubescente)				antidiarreico, antitusivo, carminativo, digestivo, febrífugo, tónico
Lamiaceae	<i>Mentha x piperita</i> L.	Hojas y tallo	Menta, menta negra (casa)	2.6			Analgésico, antidiarreico, antigripal, anti-inflamatoria, antitusivo, carminativo, digestivo, tónico
	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Hojas, flor, semilla	Albahaca blanca		6.3		Analgésico, antidiarreico, antitusivo, carminativo, hepática, digestivo, diurético, sedante, dolor de estómago, tónico
Onagraceae	<i>Oenothera rosea</i> L'Her. ex Aiton.	Tallo, flor y hojas	Shullo	3.2			Anti-inflamatorio, digestivo, diurético, hepático
Proteaceae	<i>Oreocallis grandiflora</i> (Lam.) R.Br.	Inflorescencia	Cucharillo			2.3	Anti-inflamatorio, digestivo, diurético, hepático, agente hipoglicemiante, vulnerario
Plantaginaceae	<i>Plantago major</i> L.	Planta	Llantén	9.3	12.2	6.7	Anti-inflamatorio, diurético, hepática, dolor de estómago
Geraniaceae	<i>Pelargonium odoratissimum</i> L.	Ramas	Esencia de rosa	4.1			Analgésico, antiinflamatorio, carminativo, tónico
	<i>Pelargonium graveolens</i> L'Hér. ex Aiton.	Hojas	Malva olorosa (grande)	7.1	5.7	16.3	Analgésico, antiinflamatorio, antidiarreico, carminativo, diurético
Piperaceae	<i>Peperomia inaequalifolia</i> Ruiz	Hojas, flor y tallo	Congona grande	7.7			Analgésico, cardiotónico, diurético, hepático, sedante

	& Pav.						
Rosaceae	<i>Rosa canina</i> L.	Flor	Rosa simple rosada blanca	0.5			Gripe. fiebre, tónico, estomacal
Adoxaceae	<i>Sambucus nigra</i> L.	Flor, hojas y tallo	Tilo			0.6	Antitusiva, sedante
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i> Mill.	Ramas	Mortiño				Sistema respiratorio
Tiliaceae	<i>Triumfetta althaeoides</i> Lam.	Flor, hojas y tallo	Cadillo	7.7	9.2	10.5	Analgésico, antiinflamatorio, astringente, diurético, febrífugo

**Fuente:** (Rios *et al.*, 2017), (Bailon, Romero, Tinitana, & Ostrosky, 2015), (Tinitana, 2014), (Carrión, 2012), (Alarcón, 2011), (Tene *et al.*, 2007), (Cerón, 2006).

**Elaboración:** Autor