



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Efecto quimiopreventivo de las horchatas expandidas en la ciudad de Loja

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTOR: Vivanco Ocampo, Yerardine Mayerlene

DIRECTOR: Ramírez Orellana, María Isabel, Mgtr.

LOJA – ECUADOR

2018



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>

2018

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Mgtr.

María Isabel Ramírez Orellana

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación: Efecto quimiopreventivo de las horchatas expendidas en la ciudad de Loja, realizado por Vivanco Ocampo Yerardine Mayerlene, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, diciembre de 2018

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

“Yo, Vivanco Ocampo Yerardine Mayerlene, declaro ser autora del presente trabajo de titulación: Efecto quimiopreventivo de las horchatas expendidas en la ciudad de Loja, de la Titulación Bioquímica y Farmacia, siendo María Isabel Ramírez Orellana directora del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

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

f.

Autora: Vivanco Ocampo Yerardine Mayerlene

Cédula: 0705718435

DEDICATORIA

Principalmente a Dios por siempre estar conmigo y sobre todo por haberme rodeado de personas extraordinarias que me han enseñado a vivir.

A mis padres Juan y Lida que con mucho esfuerzo y amor han hecho posible la culminación de mis estudios, así mismo a mis hermanas y hermanos que han sido apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria.

A mis amigas y amigos de toda la vida, Diana, Mabel, Evelyn, Oscar y Bryan, por estar siempre, los quiero muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a mis padres, por todo su amor y apoyo incondicional a lo largo de mis estudios.

A mi tutora de tesis, Mgtr. María Isabel Ramírez, por impartir sus conocimientos y orientación en la elaboración de este proyecto de fin de titulación.

A la Ph.D. Natalia Bailón por permitirme formar parte del laboratorio de Biología Celular y Genotoxicología, por su paciencia y enseñanzas.

Al Ph.D. Luis Guamán que con su ingenio ha influido positivamente en mi paso por el laboratorio.

A la Bqf. Gabriela González por enseñarme cordialmente las técnicas a utilizar en este proyecto, de igual manera a mis amigos y compañeros de laboratorio de Genotoxicología, Tefa, Dai, Kevin, Andrés, y los chicos de GP, por hacer del lugar de trabajo un ambiente pacífico y divertido.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARÁTULA.....	I
APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	II
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	VI
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1 Medicina tradicional.....	6
1.1.1 Plantas medicinales.....	6
1.2 Cáncer.....	7
1.2.1 Causas.....	7
1.3 Quimioprevención.....	8
1.3.1 Quimioprevención por fitoquímicos.....	8
1.4 Mutagénesis.....	8
1.4.1 Antimutagénesis.....	9
1.5 Genotoxicidad.....	9
1.5.1 Antigenotoxicidad.....	9
1.6 Ensayo cometa alcalino.....	10
1.6.1 Ciclosporina A.....	11
CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO.....	13
2.1 Objetivo General.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....	15
3.1 Obtención y preparación de los liofilizados de horchata.....	16
3.2 Modelo biológico y cultivo celular.....	16
3.3 Ensayo cometa alcalino.....	16
3.4 Ensayo de viabilidad por FDA-Bromuro de etidio.....	19
3.5 Análisis Estadístico.....	19
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	20
4.1 Ensayo de viabilidad por FDA-BrEt.....	21
4.2 Determinación de genotoxicidad mediante el ensayo cometa alcalino.....	22

4.3	Determinación de Desmutagénesis (Co-tratamiento) mediante el ensayo cometa alcalino	23
4.4	Determinación de Bioantimutagénesis (Pre-tratamiento) mediante el ensayo cometa alcalino	25
	CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....	28
	CONCLUSIONES	33
	RECOMENDACIONES.....	34
	BIBLIOGRAFÍA.....	35
	ANEXOS.....	41

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CHO-K1: Línea celular de Ovario de Hámster Chino

CsA: Ciclosporina A

D-384: Línea celular tumoral de astrocitoma cerebral

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

FDA/BrEt: Diacetato de fluoresceína / Bromuro de Etidio

FDA: Food and Drug Administration - Administración de Alimentos y Medicamentos

H: Horchata

HPLC: High Performance Liquid Chromatography - Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

IDG: Índice de daño genético

NIH: National Institutes of Health- Instituto Nacional de Salud

LMP: Bajo punto de fusión

NMP: Normal punto de fusión

OMS: Organización Mundial de la Salud

P: Peróxido de hidrógeno

SFB: Suero fetal bovino

SSBH: Solución salina balanceada Hank's

UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia

UV: Ultravioleta

RESUMEN

La horchata es una bebida preparada a partir de plantas medicinales, con actividades biológicas reportadas, de las cuales la que más nos interesa, es su posible capacidad quimiopreventiva, ya que últimamente las estrategias de prevención han tomado espacio en el campo investigativo. Según estudios previos las horchatas poseen efecto citotóxico sobre la línea celular de astrocitoma cerebral (D-384) además de poseer un efecto antigenotóxico sobre la línea celular de ovario de hámster chino (CHO-K1). Nuestros objetivos fueron determinar la capacidad genotóxica y antigenotóxica, de 4 mezclas de horchatas (H1, H2, H7, H9). Inicialmente evaluamos actividad citotóxica de varias dosis de horchatas mediante el ensayo de doble tinción FDA / BrEt, obteniendo dosis subtóxicas, propicias para posteriormente determinar efecto genotóxico y antigenotóxico a través del ensayo cometa. Nuestros resultados demostraron mediante el parámetro longitud de cola que las horchatas H1, H7 y H9 a una concentración de 1000 µg/mL generan genotoxicidad, sin embargo, H2 no produce dicho efecto. Por otro lado, poseen efecto antigenotóxico sobre leucocitos humanos, ya sea como agentes desmutágenos H2, H7 y H9 o como agente bioantimutágeno H1.

Palabras clave: Horchata, quimiopreención, cometa, genotoxicidad, antigenotoxicidad, desmutágeno, bioantimutágeno.

ABSTRACT

Horchata is a beverage prepared from medicinal plants, that have several biological properties reported, of which the one we are interested in, is its possible chemopreventive activity. This, because lately preventive strategies have taken space in the investigation field. According to previous studies horchatas possess a cytotoxic effect on the astrocytoma cell line (D-384), besides having an antigenotoxic effect on the Chinese Hamster Ovary cell line (CHO-K1). Our purposes were determining the genotoxic and antigenotoxic capability of 4 horchatas mixes (H1, H2, H7, H9). Initially we evaluate the cytotoxic activity of various doses of horchatas by the double staining assay FDA / EtBr, obtaining subtoxic doses, propitious to later determine the genotoxic and antigenotoxic effect through the comet assay. Our results showed through the tail length parameter that horchatas H1, H7 and H9 at a 1000µg/mL concentration produced genotoxicity, however, H2 does not produce such effect. On the other side, possess antigenotoxic effect on human leukocytes, as desmutagenic agents H2, H7 and H9, or as a biomutagenic agent H1.

Key words: Horchata, chemoprevention, comet, genotoxicity, antigenotoxicity, demutagen, bioantimutagen.

INTRODUCCIÓN

El ADN de organismos vivos es vulnerable a agentes que pueden dañar su estructura y la vida moderna expone constantemente a una gran cantidad de componentes químicos, físicos y biológicos que pueden interactuar de muchas maneras con el organismo humano dando como resultado efectos en la de salud asociados a alteraciones en el material genético (Bellini et al., 2006). Una de las vías más efectivas para evitar daños en el ADN y las posibles enfermedades relacionadas, sería el uso de sustancias bioactivas, que posean actividad antígenotóxica y antimutagénica, por esta razón una gran cantidad de estudios se han centrado en la búsqueda de dichas sustancias procedentes de plantas que tienen la capacidad de revertir procesos carcinogénicos (Hoshina & Marin-Morales, 2014; Loraine & José Alberto, 2010; Murillo & Mehta, 2012; Saz-Peiró & Tejero, 2016; Vanini, Barbieri, Heck, & Schwartz, 2011). Se han descubierto cientos de compuestos protectores denominados “quimio-protectores”, los mismos que pueden reducir el riesgo de enfermedades crónicas incluyendo el cáncer (Giannuzzi y Larramendy, 2013). Alrededor del mundo, el uso plantas con propiedades farmacológicas se ha vuelto uno de los recursos médicos más importantes en nuestra sociedad, a esta práctica la conocemos como medicina tradicional, indígena o popular. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la medicina tradicional es un cúmulo de conocimientos, habilidades y creencias, aplicadas en la prevención, diagnóstico, o tratamiento de enfermedades (World Health Organization, 2012).

Se conoce que el uso de plantas medicinales es común en los países latinoamericanos con grupos indígenas, como Perú, Bolivia y Ecuador (Ruiz-Pérez et al., 2014). Como es el caso de la horchata, una bebida popular y tradicional de Ecuador, concretamente de su región sur, preparada con 16 a 32 plantas medicinales, con varios efectos terapéuticos para distintos problemas de salud como reumatismo, nervios, afecciones al corazón, hipertensión, cólicos, fiebre, gripe, dolor de garganta, cabeza y estómago, gastritis, diarrea, propiedades anti estrés, tónico cerebral, hidratante, energizante, antiinflamatorio, analgésico y diurético (Rios, Tinitana, Jarrín, Donoso, y Romero, 2017). Las plantas de la horchata son expandidas como manojos en todos los mercados de la ciudad y se prepara como una infusión que es ingerida fría o caliente con otros adicionales como limón y azúcar (Rios et al., 2017).

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, a partir de liofilizados de nueve distintas mezclas de horchatas obtenidas en los mercados de la ciudad de Loja, fueron aplicados sobre la línea celular tumoral de astrocitoma cerebral (D-384) demostrando que cinco de ellas poseen un efecto citotóxico al inhibir el crecimiento celular (Bailon-Moscoso et al., 2017), a la par se probaron sobre la línea celular de Ovario de Hámster Chino (CHO-K1) donde se observó por medio del ensayo cometa alcalino que la composición de las horchatas puede incrementar tanto el daño en el ADN evaluado por la longitud de cola, como las especies reactivas de oxígeno determinadas por fluorometría, sin embargo, al mezclar las horchatas con un inductor de daño genotóxico y de

ERO como es peróxido de hidrógeno, las horchatas disminuyen la genotoxicidad como la inducción de ERO, con lo que se puede concluir un efecto antígenotóxico y antioxidativo (Palacio-Arpi y Bailón-Moscoso, 2016), posteriormente fueron aplicadas sobre el mismo modelo biológico CHO-K1, determinando la capacidad antígenotóxica de las horchatas 2, 7 y 8 por medio del ensayo de micronúcleos con tinción DAPI (Bailon-Moscoso et al., 2017).

En base a lo mencionado, en la presente investigación a partir de los ensayos, viabilidad por FDA-Bromuro de etidio y cometa alcalino, determinamos si esta bebida de consumo masivo tiene la capacidad de actuar sobre leucocitos humanos demostrando un efecto genotóxico y/o antígenotóxico. Aplicamos diversos tratamientos a partir de cuatro liofilizados de las horchatas efectivas en experimentos previos. Para determinar antígenotoxicidad y establecer o diferenciar los mecanismos involucrados en el efecto antígenotóxico se realizó dos modelos de ensayo, determinando desmutagénesis por medio de co-tratamiento y bioantimutagénesis por pre-tratamiento.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 Medicina tradicional

Es conocido en todo el mundo, que la aplicación de plantas con propiedades curativas se ha vuelto una alternativa médica muy relevante, hoy en día muchos países en desarrollo usan la medicina tradicional debido al bajo costo y acceso limitado a los tratamientos farmacéuticos (Muñoz y Cuca, 2016). Al hablar de medicina tradicional se hace referencia a los conocimientos y habilidades basadas en creencias que pasan de generación en generación, con el propósito de ser aplicadas en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, utilizando partes de la planta como hojas, tallos, flores, frutos y semillas (Scovassi y Guamán, 2013).

América del Sur es una zona de gran diversidad biológica, la medicina herbolaria es practicada por grupos étnicos y aplicada por un porcentaje representativo de la sociedad en general (Scovassi y Guamán, 2013). Ecuador destaca, por ser considerado un país megadiverso, con más de 20.000 especies botánicas, donde el 30% son útiles, y de estas el 60% medicinales (Tinitana, 2014), los conocimientos de medicina tradicional han sido directa o indirectamente los responsables del descubrimiento de nuevos principios activos frente a distintas dolencias (Muñoz y Cuca, 2016), haciendo el campo de la etnomedicina importante en nuestro medio.

1.1.1 Plantas medicinales

Las plantas como materia prima han sido usadas en medicina tradicional durante siglos (Lenzi, Malaguti, Cocchi, Hrelia, y Hrelia, 2017) , sin embargo en las últimas décadas, ha incrementado el interés por sustancias protectoras de origen botánico, que contienen antioxidantes naturales, debido a que son catalogadas como antagonistas de una variedad de enfermedades crónicas como, diabetes, hiperlipidemia, amnesia e incluso cáncer (Asadi-Samani, Bahmani, y Rafieian-Kopaei, 2014).

1.1.2 Horchata

Históricamente la horchata fue una bebida a base del tubérculo de "chufa" (*Cyperus esculentus* L.) que se bebió en los primeros tiempos de Egipto y más tarde con la conquista de Egipto por el Imperio Romano, incluyeron esta bebida en su cultura y la llamaron "orzata", posteriormente en la conquista del sur de España, comerciantes introdujeron el cultivo de la planta "chufa" en la región mediterránea (Rios, Tinitana, Jarrín, Donoso, y Romero, 2017).

En Ecuador, horchata es una infusión de hierbas que consta de entre 16 a 32 plantas, la cual ha existido en el sur andino del Ecuador desde la colonia española, y ha sido tradicionalmente preparada con plantas medicinales de la producción local (Rios et al., 2017). La horchata es una bebida cultural en la provincia de Loja, diariamente ingerida por sus habitantes con otros

adicionales como azúcar y limón. Se conoce que las diferentes plantas que conforman la horchata poseen efectos terapéuticos entre los cuales destacan, antiinflamatorio, analgésico, diurético, tónico cerebral (Rios et al., 2017). Además de efectos biológicos *in vitro* (Bailon-Moscoso et al., 2017) (Džamić et al., 2014)

1.2 Cáncer

El cáncer es un proceso complejo que consta de al menos tres pasos: iniciación, la cual es una fase irreversible donde se produce un daño en el ADN causado por la exposición de las células sanas a agentes carcinógenos, subsecuentemente la promoción, un proceso reversible caracterizado por la expansión clonal de las células iniciadas que van más allá de los mecanismos normales de proliferación celular y la regulación de la supervivencia y por último la progresión, un paso irreversible donde las modificaciones genéticas aumentan su capacidad proliferativa, invasiva y metastásica (Lenzi et al., 2017).

Los procesos relacionados en el desarrollo del cáncer son dependientes de los oncogenes y los genes de supresión tumoral, los mismos que al dejar de cumplir su función ocasionan inestabilidad genómica, modificaciones en eventos epigenéticos y como resultado una inapropiada expresión genética, neovascularización, proliferación celular y evasión de la apoptosis (Romer, Venegas, y Pérez, 2014). El cáncer se encuentra entre las principales causas de mortalidad entre población humana de todas las edades, se ha proyectado que la tasa de mortalidad por cáncer se extenderá a cerca de 30.1 millones para el año 2030 (Halabi y Sheikh, 2014).

1.2.1 Causas

En general, no es posible saber con exactitud por qué una persona padece cáncer y otra no, pero las investigaciones han indicado que ciertos factores de riesgo pueden aumentar las posibilidades. Según el Instituto Nacional de Cáncer de EE.UU, los factores que incrementan la probabilidad de desarrollar cáncer son microorganismos como virus y bacterias, hormonas, inflamación crónica, inmunosupresión, obesidad, radiación, tabaco, ingesta excesiva de alcohol, desequilibrio dietético, especialmente la falta de alimentos que contienen antioxidantes es una de las principales influencias en el riesgo de cáncer (NIH, 2015). Para reducir el riesgo se podría evitar o disminuir la exposición a los carcinógenos ya identificados además de modificaciones relevantes en el estilo de vida.

1.3 Quimioprevención

Además de las distintas formas terapéuticas tradicionales como: quimioterapia, intervención quirúrgica y radioterapia; la quimioprevención ha adquirido gran relevancia en la lucha contra el cáncer (Lenzi et al., 2017). El término quimioprevención, está definido como el uso de agentes naturales, sintéticos o biológicos que tiene como fin revertir, suprimir y prevenir las fases iniciales de la carcinogénesis o la progresión de las células hacia metástasis (Steward y Brown, 2013).

La quimioprevención es considerada como una posible alternativa para reducir la incidencia de cáncer y por ende la mortalidad relacionada con esta enfermedad (de Oliveira et al., 2017), ya que posee la capacidad de evitar las diferentes etapas del proceso de carcinogénesis como son la iniciación, promoción y progresión tumoral (Steward y Brown, 2013), para evitar el paso de iniciación, los agentes bloqueadores intervienen en la interacción del carcinógeno con la diana, mientras que los agentes supresores evitan la promoción del cáncer relentizando la división de la célula e induciendo la muerte celular; para que un agente quimiopreventivo sea exitoso debe ser específico para células cancerosas y de baja toxicidad en células sanas (Lenzi et al., 2017).

1.3.1 Quimioprevención por fitoquímicos

Dada la gran complejidad estructural de los fitoquímicos, no es posible definir la relación de estructura actividad para deducir con precisión sus mecanismos moleculares. Por lo que se podría decir que la capacidad de un fitoquímico quimiopreventivo para prevenir el desarrollo de tumores es el resultado de la combinación de un conjunto de efectos intracelulares, en lugar de una sola respuesta biológica (Surh, 2003).

Según Steward y Brown en el año 2013, mencionan que la quimioprevención puede implicar la perturbación de una variedad de pasos en la iniciación, promoción y progresión tumoral, de aquí la clasificación a los agentes de acuerdo con los efectos que tienen en diferentes etapas de la carcinogénesis, los cuales son denominados como: agentes bloqueadores y agentes supresores (Steward y Brown, 2013).

1.4 Mutagénesis

El concepto de mutagenicidad está definido como la inducción de cambios hereditarios en el material genético de los seres vivos, que puede dar como resultado cambios fenotípicos. Los componentes mutagénicos pueden ser de diversos orígenes y estar presentes en el ambiente, lo que constituyen un factor de riesgo que podría finalmente llegar a un proceso neoplásico (de Oliveira et al., 2017).

1.4.1 Antimutagénesis

La antimutagénesis es el evento que induce a contrarrestar o eliminar los daños inactivando los efectos de los agentes mutagénicos (de Oliveira et al., 2017). En el año 1987, Kada y sus colaboradores clasificaron a los antimutágenos en dos categorías:

a) Desmutágenos: El término desmutágeno se refiere a aquellos agentes que actúan en forma directa con el mutágeno, modificándolo, ya sea en su estructura química o bioquímica, trayendo consigo reacciones de metabolización dentro del organismo antes que el mismo alcance la célula diana, algunos desmutágenos inhiben la acción del sistema enzimático P450 involucrado en la activación de mutágenos.

b) Bioantimutágenos: Estos incrementan la fidelidad en la replicación, promueven la reparación del daño sobre el ADN y están involucrados en la estimulación de la reparación libre de errores y en la inhibición del sistema de reparación con error. Son agentes biológicamente activos que interfieren con las funciones celulares que determinan los procesos de mutagénesis o reparación del ADN, esto conlleva a una disminución de la frecuencia de las mutaciones tanto inducidas como espontáneas.

1.5 Genotoxicidad

El concepto de genotoxicidad se define como el efecto que causa modificaciones a nivel de material genético, estudia los factores o agentes que causan estos daños, los cuales pueden producir mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, reordenamientos y cambios en el número de cromosomas, en células somáticas o germinales (Phillips y Arlt, 2009). Un compuesto es considerado genotóxico si tiene afinidad para interaccionar con el ADN e inducir daño genético a concentraciones que no son tóxicas o que están asociadas a un bajo grado de toxicidad (Martínez-González, 2005). Efectos genotóxicos pueden traducirse a mutaciones y aberraciones cromosómicas.

Las lesiones en el material genético pueden aumentar el riesgo de padecer cáncer, problemas reproductivos y otras afecciones (Castro, Ramírez, y Cuenca, 2004).

1.5.1 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. Por lo tanto antigenotoxicidad es un evento que conduce a eliminar o disminuir el daño en material genético, como el ADN y componentes celulares relacionados con la funcionalidad de la célula

como el huso mitótico, proteínas de reparación, de condensación y descondensación (Pillco y Rodrigo, 2005).

1.6 Ensayo cometa alcalino

El ensayo cometa alcalino es elaborado posteriormente a la evaluación de viabilidad celular, donde se determinan dosis subtóxicas con las cuales se procede a la medición de genotoxicidad.

Viabilidad celular por FDA/ Bromuro de Etidio

Las técnicas para evaluar la viabilidad celular permiten medir la proporción de células viables después de un procedimiento potencialmente traumático donde se produce un aumento incontrolado de la permeabilidad de la membrana, lo cual influye en la proliferación celular y supervivencia (Palacio-Arpi y Bailón-Moscoso, 2016).

El ensayo consiste en realizar una doble tinción con FDA / Bromuro de Etidio, donde las células vivas fluorescen en verde debido a que el diacetato de fluoresceína, no fluorescente, penetra por difusión facilitada y las esterasas lo metabolizan y la forma esterificada es fluorescente, dando la coloración a las células vivas, mientras que en las células muertas el bromuro de etidio entra por difusión simple y se intercala en el ADN y emite una fluorescencia en color rojo bajo un microscopio de fluorescencia (Bernabeu, Triana, Casanova, y Piñeiro, 2002).

El ensayo de electroforesis en gel de células individuales conocido como cometa alcalino, es una prueba de genotoxicidad altamente sensible y muy bien establecida que se ha aplicado para detectar un amplio espectro de daño en el material genético. En la versión alcalina de esta prueba, la cadena de ADN se rompe y se detectan sitios lábiles, donde la extensión de las migraciones del ADN fragmentado es directamente proporcional a la cantidad de daño en el material genético de la célula (Barcelos, Shimabukuro, Maciel, y Cólus, 2007).

El ensayo cometa alcalino permite la adaptación de otros procedimientos, como ensayos de reparación, los mismos que se realizan luego de exponer el modelo biológico a la acción de un agente con espectro lesional conocido. Los ensayos se pueden elaborar con intervalos de tiempo para monitorear la cinética de incisión y remoción de fragmentos, por lo tanto la reparación se determina a partir de las mediciones de la migración del ADN en función del tiempo (Cossio, González, García, y Prieto, 2004).

1.6.1 Ciclosporina A

En 1976 el bioquímico belga Jean Borel, perteneciente a la compañía farmacéutica Sandoz buscando un nuevo antifúngico encontró un hongo conocido como *Tolypocladium inflatum*, descubrió su acción inmunosupresora revolucionando así la clínica de los trasplantes de órganos. Más tarde en 1983 fue aprobada e introducida en los protocolos de inmunosupresión a nivel mundial (Pérez De Hornedo, De Arriba, Calvino, Benito, y Parra Cid, 2007).

Sin embargo los fármacos inmunosupresores efectúan cambios sobre el sistema inmune disminuyendo la inmunocompetencia, asociándolo con un aumento en la incidencia de cáncer, independientemente de las condiciones genéticas, los fármacos inmunosupresores favorecen el desarrollo de leucemia aguda y linfoma (Campistol y Morales, 2009). La ciclosporina A (CsA) que es un compuesto de naturaleza peptídica, con estructura cíclica se une con alta afinidad a una familia de proteínas citoplasmáticas presentes en la mayoría de las células, conocida como ciclofilinas. El complejo droga receptor consistente en la molécula de CsA y la ciclofilina, se une específica y competitivamente a la calcineurina y la inhibe, impidiendo la translocación de un factor de transcripción, el NF-AT (Figura 1), es decir inhibe la activación de los linfocitos T y la respuesta inmune mediada por los mismos (Bernabeu et al., 2002).

La CsA provoca efectos colaterales indeseables sobre todo en el hígado y el riñón, a través de un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno, pérdida de grupos tiol de las proteínas, y descenso de la capacidad antioxidante, lo cual trae como consecuencia alteraciones estructurales y funcionales de las células (Bernabeu et al., 2002), efectos atribuidos a la droga madre como a los metabolitos resultantes de su biotransformación por el sistema de citocromo P450 (Araujo, Posleman, y Rodríguez, 2007). Aunque existe evidencia limitada de la genotoxicidad de CsA, se han reportado mutaciones en linfocitos humanos *in vitro* y la incidencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de riñones de pacientes transplantados (Silva-Alvarado, 2005).

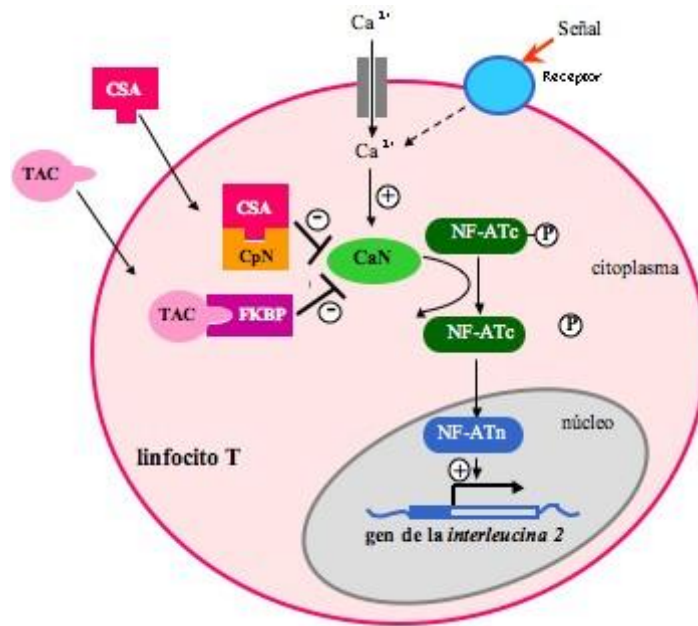


Figura 1. Mecanismo de acción de Ciclosporina A. La ciclosporina genera su efecto de acción inmunosupresora, con la unión a un receptor de la inmunofilina intracelular: ciclofilina(CpN), después, como parte de un complejo ciclosporina-ciclofilina que inhibe la actividad fosfatasa de la calcineurina (CaN) que favorece la migración del NF-AT (factor nuclear de las células T activadas) del citoplasma al núcleo, lugar donde activaría la transcripción del gen de la interleucina-2. Y así la CsA actuaría bloqueando la fase G₀ a G₁ del ciclo celular.

Fuente y elaboración: (Trimachi, 2014)

CAPÍTULO II. FIN DEL PROYECTO

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto quimiopreventivo de liofilizados de horchatas expandidas en la ciudad de Loja sobre leucocitos humanos.

2.2 Objetivos Específicos

- Evaluar la actividad citotóxica de un grupo de 4 horchatas (H1, H2, H7, H9) mediante el ensayo de doble tinción FDA / BrEt.
- Evaluar la capacidad genotóxica de las 4 mezclas de horchatas.
- Evaluar la capacidad antigenotóxica de las 4 mezclas de horchatas, determinando si actúan como agente desmutágeno o bioantimutágeno sobre células leucocitarias humanas mediante ensayo cometa alcalino.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1 Obtención y preparación de los liofilizados de horchata

Las plantas que se usaron para la preparación de los liofilizados de horchata fueron obtenidas en los distintos mercados de la ciudad de Loja y donadas por la Ph.D. Fani Tinitana, docente investigadora de la Sección Departamental de Sistemática y Diversidad.

El proceso de liofilización lo llevo a cabo el Ph.D. Juan Carlos Romero, del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la UTPL. Inicialmente se clasifico y pesó las plantas que componen cada mezcla de horchata (Anexo1), posteriormente se realizó una infusión con un litro de agua para cada una, se llevó a ebullición por 10 minutos, se filtró y dispensó dentro de la cabina de flujo laminar en frascos Boeco de 500 mL, se dejó enfriar para luego ser congelados a -80°C con una inclinación de 45° , la liofilización se realizó en el equipo LABCONCO modelo 7754047, en un período de 48 horas, para más tarde trasvasar a frascos Boeco de 100 mL. Se determinó el rendimiento y luego se almaceno a 5°C hasta su uso.

Los liofilizados de horchatas fueron diluidos en medio RPMI 1640 (GIBCO) a una concentración de $1000\ \mu\text{g/mL}$ y almacenados a 5°C .

3.2 Modelo biológico y cultivo celular

Se tomó como modelo biológico leucocitos humanos, de varones de entre 18 a 30 años de edad, aparentemente sanos, que no se encontraban bajo régimen de medicamentos.

Los leucocitos fueron cultivados en medio base RPMI – 1640, suplementado con suero fetal bovino (SFB), al 10%(GIBCO), L-Glutamina 2 mM (GIBCO), y antibiótico-antimicótico (penicilina G 100 U/mL, estreptomina 100 $\mu\text{g/mL}$ y anfotericina B 25 $\mu\text{g/mL}$) al 1% (GIBCO), incubadas a 37°C con 5 % de CO_2 y atmósfera húmeda.

3.3 Ensayo cometa alcalino

Previo a iniciar el protocolo del ensayo se prepararon las placas desengrasadas, donde colocamos 130 μL de agarosa de normal punto de fusión (NMP) al 1% (Invitrogen), se extendió por toda la superficie y fueron almacenadas a temperatura ambiente, libre de polvo hasta su uso.

La siembra se realizó en cabina de flujo laminar, donde:

Control negativo = **control -**: medio RPMI – 1640

Control positivo = **CsA**: ciclosporina a 10 $\mu\text{g/mL}$ en medio RPMI

Horchatas= **H**: horchatas a 1000 $\mu\text{g/mL}$ en medio RPMI y células

Los ensayos realizados se desarrollaron de acuerdo al esquema de la Figura 2

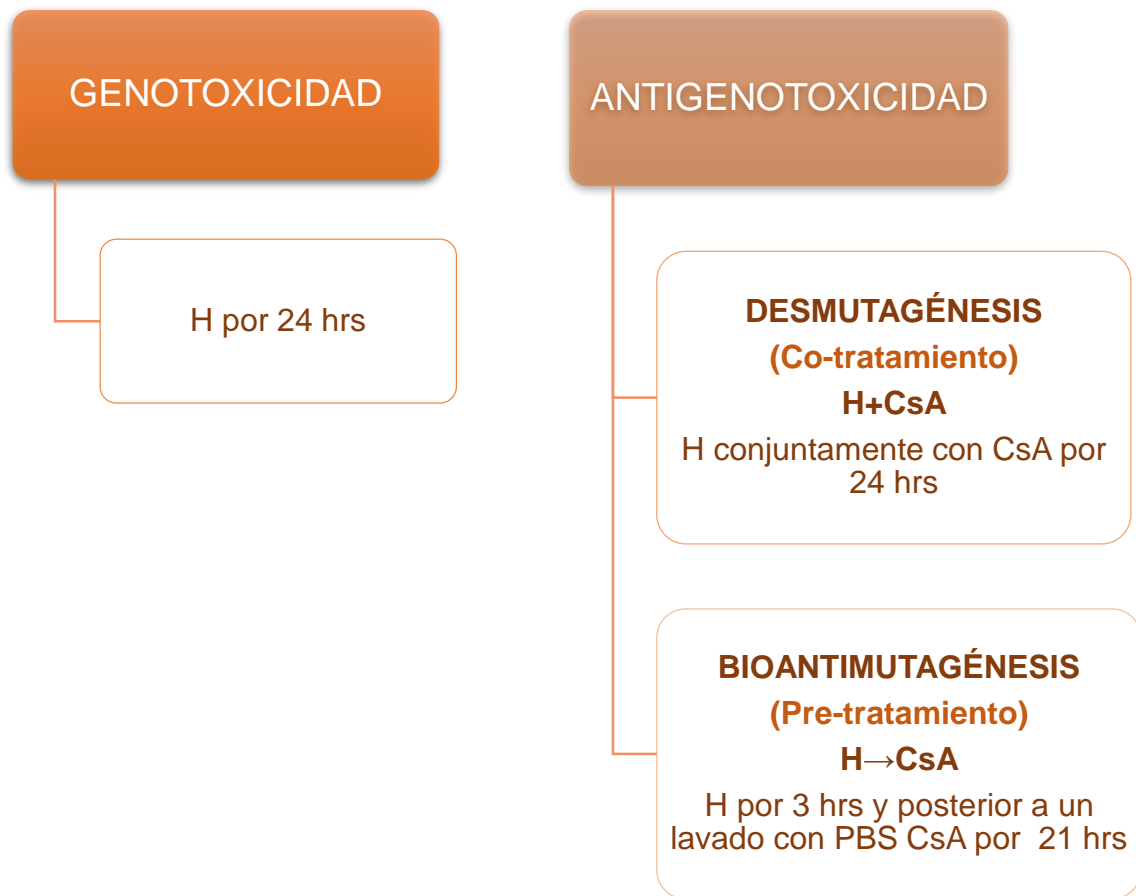


Figura 2. Metodología utilizada en el ensayo cometa alcalino, para la determinación de genotoxicidad y antigenotoxicidad, horchatas H1, H2, H7, H9 a una concentración de 1000 µg/mL, CsA a una concentración de 10 µg/mL.

Fuente y elaboración: Autor

Para el proceso de cosecha centrifugamos los tubos por 2 min a 10000 rpm, eliminamos el sobrenadante y resuspendimos el pellet con 1 mL de medio suplementado, centrifugamos nuevamente a las mismas condiciones, eliminamos el sobrenadante, transfiriendo 20 µL de pellet celular hacia otro microtubo para posteriormente realizar el ensayo de viabilidad por doble tinción con FDA/BrEt, el pellet restante fue utilizado para el ensayo cometa alcalino, donde se adicionó 150 µL de agarosa (LMP), de esta mezcla células – agarosa se tomó 75 µL y se la colocó en los portaobjetos preparados anteriormente, se colocó cubreobjetos y refrigeramos, pasados 10 minutos se retiraron los cubreobjetos, para agregar una nueva capa de agarosa (LMP) 130 µL, nuevamente se colocó los cubreobjetos para refrigerar por 10 minutos. Posteriormente las placas se colocaron 4 horas en una solución de lisis del día:

10 % de DMSO (SIGMA), 1 % tritón X-100 (SIGMA), 2.5 M NaCl (MERCK), 100 mM EDTA (INVITROGEN), 10 mM Tris (INVITROGEN), NaOH (MERCK), y pH 10.

Inicialmente, las placas fueron colocadas durante 20 minutos en una cubeta de electroforesis la cual contenía el buffer de corrida: 300 mM NaOH (MERCK), 1 mM EDTA (INVITROGEN) y pH >13), con el fin de generar desnaturalización del ADN, posteriormente se realizó la electroforesis en condiciones de 25 V, 300 mA y 20 minutos, terminada la corrida, las placas fueron colocadas en un buffer de neutralización: 9.7 g Tris a pH 7.5, para deshidratarlas fueron lavadas con metanol y almacenadas.

Se realizó la hidratación de las placas para su lectura con agua desionizada fría, la tinción se realizó con 60 µL de Bromuro de Etidio (1.5 g/ml) extendidos con el cubreobjetos, mediante el software Comet Assay IV, en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) se contaron 100 células por placa. la evaluación del daño se hizo midiendo la cantidad de ADN migrado utilizando diferentes parámetros como la medición de largo de cola e intensidad de cola del cometa con el cual se calculó el índice de daño genético (IDG) que nos permitió establecer una escala que va de 0 a 4 dependiendo del daño genético de cada célula como se ve en la Figura 3.

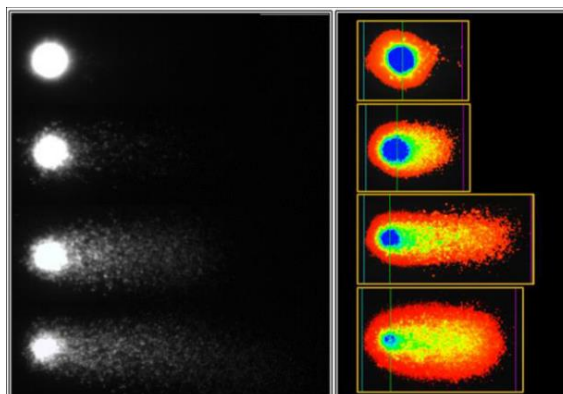


Figura 3. Ensayo cometa, niveles de daño en el ADN, en base a la migración de fragmentos por electroforesis. Captada por la cámara en escala de grises (izquierda) y convertida, al formato digital con el software Comet Assay IV (derecha).

Fuente y elaboración: (Rueda y Mitma, 2016)

3.4 Ensayo de viabilidad por FDA-Bromuro de etidio

Para evaluar la viabilidad de las células se aplicó 20 μ L de FDA/BrEt y se homogenizó, posteriormente pasamos 20 μ L de esta mezcla al portaobjetos, para extender colocamos el cubreobjetos.

Después realizamos el conteo celular en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus) analizando un total de 200 células entre vivas y muertas por cada uno de los tratamientos y estos por duplicado.

3.5 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico se tomaron los porcentajes de viabilidad de los tres ensayos y se utilizó la prueba de comparación múltiple ANOVA con post test Dunnet. Los resultados obtenidos en el ensayo cometa fueron analizados estadísticamente dependiendo del parámetro, el IDG mediante ANOVA con post test Dunnet y longitud de cola con el test no paramétrico de Kruskal – Wallis con post test de Dunns, calculados por medio del software estadístico GraphPad Prism® 5.0

CAPÍTULO IV. RESULTADOS

4.1 Ensayo de viabilidad por FDA-BrEt

Según los resultados obtenidos en el ensayo de doble tinción por FDA-BrEt, determinamos mediante la prueba de comparación múltiple ANOVA con post test Dunnet que existe diferencia significativa entre los controles negativo y positivo, donde la viabilidad del control negativo resulto del 96 % demostrando una adecuada manipulación de las células y correcto desarrollo del ensayo, por otro lado, en el control positivo (CsA 10 µg/mL) obtuvimos el 77% de células vivas.

Según el análisis ANOVA, en la Figura 6 A no se observó diferencia significativa entre el control negativo y los tratamientos de las mezclas de horchatas (H1, H2, H7, H9) a una concentración de 1000 µg/mL.

Por otro lado, en los modelos para determinación de antigenotoxicidad, se evidenció una disminución de la viabilidad en co-tratamientos (H + CsA) (Figura 6 B). De igual manera en el pre tratamiento (H→CsA), observamos en la Figura 6 C viabilidades cercanas al 70%, similares a la de las células únicamente expuestas a CsA.

Aunque existen porcentajes relevantes de muerte celular en co-tratamiento y pre-tratamiento, la viabilidad mayor al 70 % indica que las concentraciones son suficientes para calificarlas como subtóxicas y adecuadas para las pruebas de genotoxicidad.

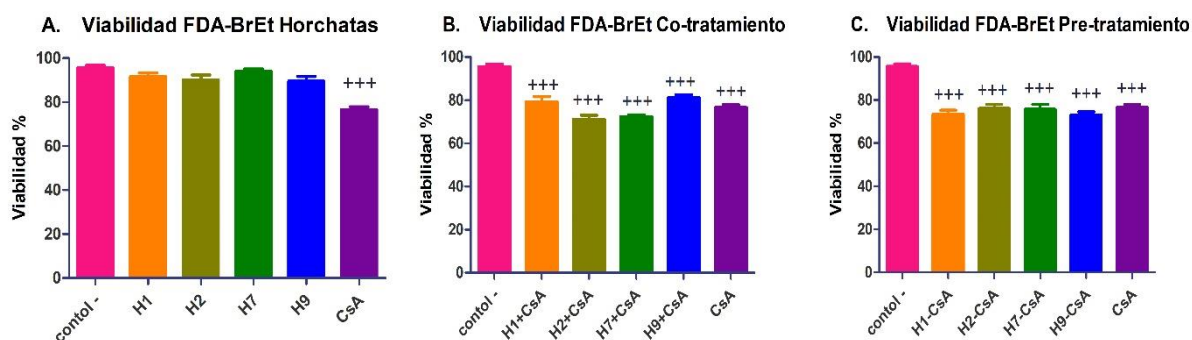


Figura 6. Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio de leucocitos humanos **A** expuestos a dosis de 1000 µg/mL de 4 horchatas (H1, H2, H7, H9) a 24 horas, **B** horchatas a 1000 µg/mL más CsA a 10 µg/mL por 24 horas, **C** horchatas a 1000 µg/mL por 3 horas y posterior la aplicación de CsA a 10 µg/mL por 21 horas, y controles: negativo (medio RPMI suplementado), positivo: (CsA a 10 µg/mL). Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes. Se analizó mediante ANOVA post test Dunnet (+++: p<0.0001). frente al control negativo.

Fuente y elaboración: Autor

4.2 Determinación de genotoxicidad mediante el ensayo cometa alcalino

La genotoxicidad de las horchatas se midió con el parámetro el índice de daño genético (IDG), y longitud de cola. En la **Figura 7** se observa el IDG generado por las horchatas, bajo el análisis estadístico ANOVA con post test Dunnet, donde podemos observar que no existe diferencia entre las horchatas H1, H2, H7 y H9 con respecto al control negativo, sin embargo, al analizar la longitud de cola (**Figura 8**) con análisis Kruskal-Wallis y post-test de Dunns, se aprecia diferencia significativa del control negativo con las H1, H7 y H9.

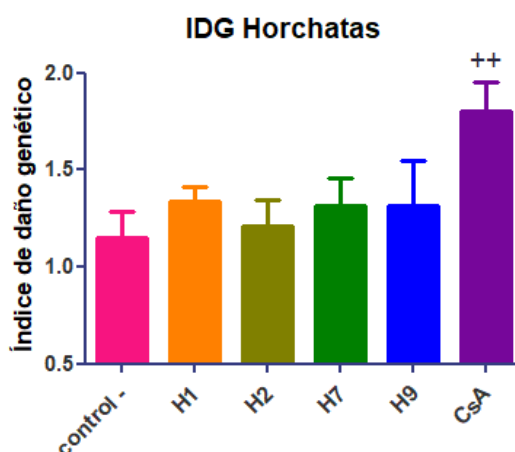


Figura 7. Índice de daño genético de leucocitos humanos expuestos a dosis de 1000 µg/mL de 4 horchatas (H1, H2, H7, H9) y controles: negativo (medio RPMI suplementado), positivo: (CsA a 10 µg/mL). Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes. Se analizó mediante ANOVA post test Dunnet, (+: $p < 0.05$, ++: $p < 0.001$) frente al control negativo.

Fuente y elaboración: Autor

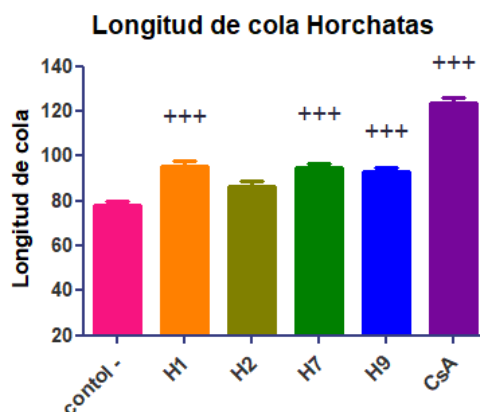


Figura 8. Longitud de cola de leucocitos humanos expuestos a dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 4 horchatas (H1, H2, H7, H9) y controles: negativo (medio RPMI suplementado), positivo: (CsA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes. Se analizó mediante Kruskal- Wallis- post test Dunns; (+++: $p < 0.0001$) frente al control negativo.

Fuente y elaboración: Autor

Evaluación Antigenotóxica

En búsqueda de los mecanismos de acción del compuesto se propusieron 2 modelos distintos, desmutagénesis y bioantimutagénesis.

4.3 Determinación de Desmutagénesis (Co-tratamiento) mediante el ensayo cometa alcalino

Con respecto a la evaluación de las horchatas como posibles agentes desmutágenos, se observa en la **Figura 9** el IDG generado por la exposición a las horchatas en combinación con CsA, en donde no se observan diferencias entre las células expuestas a CsA y el co-tratamiento.

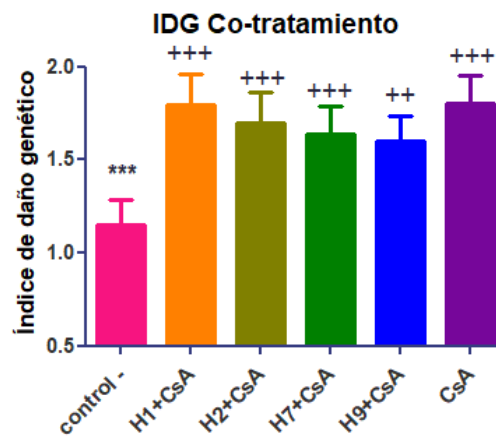


Figura 9. Índice de daño genético de leucocitos humanos expuestos a dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 4 horchatas (H1, H2, H7, H9) más CsA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas y controles: negativo (medio RPMI suplementado), positivo: (CsA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes. Se analizó mediante ANOVA post test Dunnet (+++: $p < 0.0001$, ++: $p < 0.001$) frente al control negativo y (***: $p < 0.0001$) frente al control positivo.

Fuente y elaboración: Autor

Por otro lado, tomando en cuenta la longitud de cola de los cometas con análisis Kruskal-Wallis (**Figura 10**) evidenciamos una reducción en los co-tratamientos con H2, H7 y H9, los mismos que son diferentes a CsA, sin embargo, estos valores no llegan a niveles basales ya que mantienen las diferencias con respecto al control negativo.

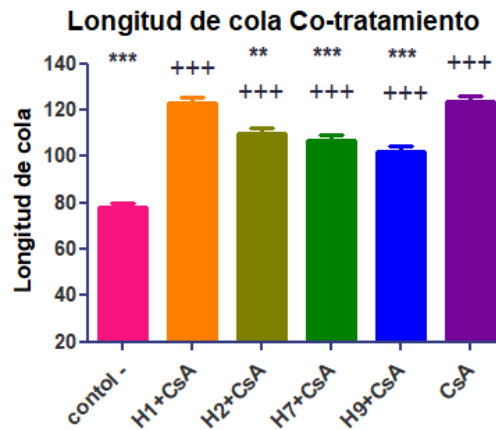


Figura 10. Longitud de cola de leucocitos humanos expuestos a dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 4 horchatas (H1, H2, H7, H9) más CsA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas y controles: negativo (medio RPMI suplementado), positivo: (CsA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes. Se analizó mediante Kruskal- Wallis- post test Dunns (+++: $p < 0.0001$) frente al control negativo y (***: $p < 0.0001$, **: $p < 0.001$). frente al control positivo.

Fuente y elaboración: Autor

4.4 Determinación de Bioantimutagénesis (Pre-tratamiento) mediante el ensayo cometa alcalino

En el pre-tratamiento donde CsA fue colocada posterior a tres horas de incubación con las horchatas, se observa (**Figura 11**) mediante IDG con análisis estadístico ANOVA, que el efecto de las horchatas en co-tratamiento es semejante al de CsA; es decir son diferentes a los valores basales.

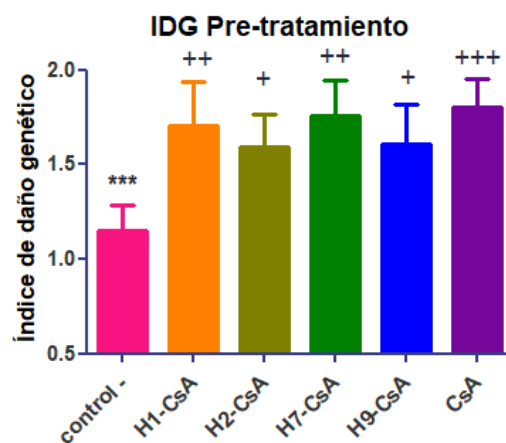


Figura 11. Índice de daño genético de leucocitos humanos expuestos a dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 4 horchatas (H1, H2, H7, H9) por 3 horas y posterior la aplicación de CsA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 21 horas, controles: negativo (medio RPMI suplementado), positivo: (CsA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes. Se analizó mediante ANOVA post test Dunnet (+: $p < 0.01$) frente al control negativo y (**: $p < 0.001$) frente al control positivo.

Fuente y elaboración: Autor

Mientras en longitud de cola, con análisis Kruskal-Wallis y post test Dunns se puede evidenciar una notable disminución de este parámetro con diferencia significativa en el pre tratamiento H1→CsA con respecto a (CsA), sin embargo, estos valores siguen siendo mayores a los basales. (**Figura 12**) .

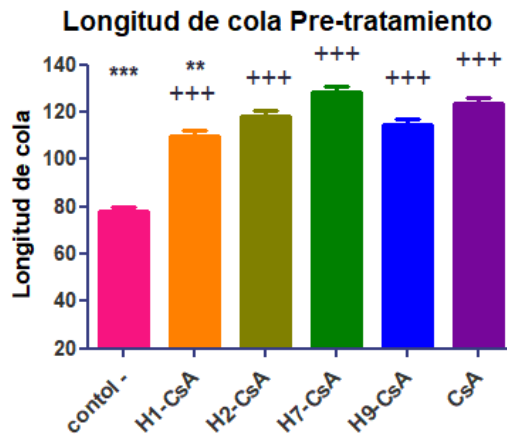


Figura 12. Longitud de cola de leucocitos humanos expuestos a dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de 4 horchatas (H1, H2, H7, H9) por 3 horas y posterior la aplicación de CsA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 21 horas, controles: negativo (medio RPMI suplementado), positivo: (CsA a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los datos estadísticos de cada ensayo representan la media y su error estándar de tres experimentos independientes. Se analizó mediante Kruskal-Wallis-post test Dunns (+++: $p < 0.0001$) frente al control negativo y (***: $p < 0.0001$, **: $p < 0.001$) frente al control positivo.

Fuente y elaboración: Autor

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

Investigaciones recientes acerca de las horchatas demuestran su efecto citostático y citotóxico en la línea celular de astrocitoma cerebral D-384, y posteriormente sus propiedades antigenotóxicas y antioxidantes en células inmortalizadas CHO K-1 (Bailon-Moscoso et al., 2017). Sin embargo, es necesario conocer con mayor profundidad las propiedades de la bebida representativa del sur del Ecuador, denominada horchata. Según la literatura varias de las plantas que componen esta bebida son consideradas antigenotóxicas, antimutagénicas y antioxidantes (Palacio-Arpi y Bailón-Moscoso, 2016) (Džamić et al., 2014) (Tomás-Barberán, 2003). Se conoce que los antimutágenos naturales presentes en la dieta constituyen una opción importante como agentes quimiopreventivos contra el cáncer y otros padecimientos (Arecibia, Rosario, López, y Díaz, 2003). La quimioprevención involucra el uso de determinadas sustancias químicas, naturales o sintéticas con vista a impedir o revertir la carcinogénesis evitando el desarrollo de una neoplasia maligna invasora (Martínez, 2009).

Con el fin de determinar el efecto quimiopreventivo de las horchatas se realiza el ensayo cometa alcalino, basado en la cuantificación de fragmentos de ADN que migran del núcleo celular durante la electroforesis dependiendo del daño generado en el material genético (Liao, McNutt, y Zhu, 2009); utilizando como control positivo CsA, la misma que induce un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Bernabeu et al., 2002) y que en estudios ha reportado que produce mutaciones en linfocitos humanos *in vitro* y aumento en la incidencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos de riñones de pacientes transplantados (Silva-Alvarado, 2005), características que la hacen ideal para su uso como control positivo en el ensayo de genotoxicidad. Con el fin de determinar la capacidad genotóxica y antigenotóxica *in vitro* de un grupo de liofilizados de horchatas (H1, H2, H7, H9) en leucocitos humanos, para lo cual se establecieron dos modelos de estudio, co-tratamiento y pre-tratamiento.

Los efectos genotóxicos se producen normalmente a dosis subtóxicas, es decir a dosis a las cuales no se ve comprometida la viabilidad celular (Bello y López, 2001). Por lo tanto, en el ensayo de citotoxicidad por FDA-BrEt buscamos determinar estas dosis, las mismas que deben generar una viabilidad no menor al 70%. Nuestros resultados en el control negativo exponen viabilidad superior al 90 %, corroborando la validación del ensayo, mientras el control positivo CsA a 10 µg/mL mostró una viabilidad de 77%, concentración elegida por su capacidad de generar genotoxicidad mediante estrés oxidativo sobre leucocitos humanos y no causar citotoxicidad a un porcentaje mayor al 30%.

Las células tratadas con horchatas H1, H2, H7 y H9 a una concentración de 1000 µg/mL, tuvieron una viabilidad superior al 90%. Estudios realizados por Jaramillo-Vélez y Bailón-Moscoso (2017), demuestran que las horchatas ejercen un efecto inhibitorio sobre un panel

de 5 líneas celulares tumorales humanas, de las cuales resalta D-384 como la línea celular con mayor sensibilidad al tratamiento aplicado, sin embargo, no se reportan efectos sobre linfocitos humanos y células CHO-K1, lo cual nos lleva a la conclusión de que el efecto inhibitorio presentado por las horchatas en estudio, es específico para células tumorales.

La viabilidad decrece en pre-tratamiento y de manera semejante en co-tratamiento muy probablemente por la presencia de CsA, a diferencia de los estudios realizados *in vivo* por Zamorano-Ponce, Fernández, Vargas, Rivera, y Carballo (2004), en donde al aplicar una infusión de *Aloysia triphylla* y posteriormente cisplatino, produce un efecto protector aumentado la viabilidad celular respecto al control positivo.

Los resultados de esta investigación fueron presentados con IDG y longitud de cola. El IDG, es un parámetro cualitativo calculado a partir de la intensidad de cola, donde los cometas son separados por categorías de daño, la puntuación total se calcula multiplicando el porcentaje medio de nucleoides en cada clase por el factor correspondiente (Barbosa, Muskus, Orozco, y Pabón, 2017), mientras que longitud de cola, es un parámetro cuantitativo, que mide la distancia horizontal desde el centro de la cabeza del cometa hasta el final de la cola, considerado como el indicador geométrico más representativo del daño genotóxico (Rueda y Mitma, 2016). Por lo antes mencionado se eligió longitud de cola como parámetro de discusión.

En cuanto al ensayo de electroforesis en gel de células individuales o cometa alcalino, donde se midió la genotoxicidad de las horchatas sobre leucocitos humanos a una concentración de 1000 µg/mL por un período de 24 horas, se determinó que H1, H7 y H9 interactúan con el ADN generando genotoxicidad, al igual que en los resultados obtenidos por Palacio-Arpi y Bailón-Moscoso (2016), donde menciona que las horchatas de H1-H9 aplicadas en CHO-K1 a concentraciones de 100, 333 y 1000 µg/mL generan daño al ADN.

Por otro lado, H2 no produce daño genético, al igual que en los resultados de Aguilar y Bailón-Moscoso (2017), donde describe que las horchatas H2, H7 y H8 no muestran efecto genotóxico a 1000 µg/mL en la línea celular inmortalizada CHO-K1. Al igual que en la investigación de Ricco, Wagner, Reides, y Carballo (2010), donde demuestra que infusiones utilizadas en medicina natural de una variedad de especies de la familia verbenaceae, no generan actividad genotóxica en el ensayo cometa alcalino.

Posteriormente para determinar los mecanismos de antigenotoxicidad de las horchatas, usamos los ensayos de **co-tratamiento**, donde mediante longitud de cola se observa disminución notable del daño genético con las horchatas H2, H7 y H9 y aunque no lleguen a nivel basal, las horchatas en cuestión tienen la capacidad de actuar con el agente genotóxico,

ya sea modificándolo en su estructura química o bioquímica (Giannuzzi y Larramendy, 2013), esto podría ser el resultado de la combinación de plantas que conforman en mayor proporción estas horchatas, como *Linum usitatissimum* L, oleaginosa que posee un contenido alto del ácido graso poliinsaturado alfa-linoléico (Omega-3), proteínas, ligninas, vitaminas y minerales, que son sustancias relacionadas a la reducción del riesgo de enfermedades cardiovasculares y cáncer, además poseen propiedades con actividad anti-inflamatoria, efecto laxante y antioxidante (K. Lenzi, Spreafico, Teles, y Guzmán, 2008), *Pelargonium graveolens* L'Herit, que contiene gran cantidad de compuestos flavonoides (Ćavar y Maksimović, 2012), e *Iresine herbstii* Hook que contiene isoflavonas y betacianinas aciladas.(Nweze, Nwachukwu, y Adieme, 2016), por lo tanto se encuentran compartiendo compuestos bioactivos como flavonoides que, en estudios *in vitro* y en modelos animales han demostrado la capacidad de actuar contra diferentes tipos de cáncer induciendo apoptosis en algunas líneas de células neoplásicas, mientras que excluye de ese efecto a las células sanas (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, y Bravo, 2014);o isoflavonas que poseen un efecto antioxidante, con la capacidad de disminuir ERO en células con procesos inflamatorios (Peñarrieta et al., 2014).

Finalmente en los ensayos de **pre-tratamiento** las horchatas no parecen proteger las células del daño posterior al que se les induce al aplicarles CsA, con excepción de H1, la cual disminuye significativamente el efecto causado por CsA, visible con el parámetro longitud de cola y aunque dicha disminución no llegue a un nivel basal, concluimos que H1 actúa sobre los mecanismos fisiológicos de protección y reparación del ADN, revirtiendo los efectos genotóxicos de CsA y consecuentemente la fijación de mutaciones (Barcelos et al., 2007), este hecho, puede ser debido a la presencia única en H1 de la planta *Sambucus nigra* L, que contiene polifenoles, flavonoides y antocianos, que además de proteger y estabilizar el genoma, proporcionan propiedades antioxidantes, antimutagénicas y anticarcinogénicas (Montalvo et al., 2007) (Tomás-Barberán, 2003). La actividad antioxidante en estos compuestos se ha asociado a su habilidad para eliminar los radicales libres e inhibir el citocromo P450 o enzimas con actividad oxidante como las ciclooxigenasas y las lipooxigenasas (Arencibia et al., 2003). La presencia de una planta mayoritaria con respecto a las demás horchatas, como *Solanum americanum* Mill, que posee flavonoides y alcaloides en mayor proporción (Solis, 2014), según Ríos, Fuertes, Arroyo, y Ruiz (2017) los alcaloides de origen vegetal como alcaloides de la vinca, placitaxol y berberina poseen actividad anticancerígena. *Solanum americanum* Mill, contiene además triterpenos, que poseen actividad biológica, donde destacan sus efectos quimiopreventivos, por la estimulación de la actividad enzimática del sistema endógeno glutation S-transferasa, por lo tanto, su ingestión cataliza las acciones destoxicantes del organismo frente agentes cancerígenos (Bello, 2012). Por último, la presencia de la planta con mayor concentración en esta horchata es

Pelargonium graveolens L'Herit, que contiene flavonoides, tales como quercetina y miricetina (Pombo et al., 2016), que son los más estudiados *in vivo*; ya que la quercetina es reconocida por su elevada actividad antioxidante, evitando o retrasando algunos tipos de daño a las células y, por tanto, la disminución del riesgo de enfermedades crónicas y degenerativas (Torres, Gil, Cano, y Sosa, 2010).

Nuestro estudio determina que la horchata H2 no genera genotoxicidad a diferencia de H1, H7 y H9, sin embargo al ser aplicadas con un inductor de daño genotóxico tienen la capacidad de disminuir la genotoxicidad sobre leucocitos humanos, ya sea su efectividad en el modelo de co-tratamiento como desmutágenos (H2, H7 y H9) o en pre-tratamiento como bioantimutágenos (H1), corroborando así los resultados de las investigaciones de Palacios en 2016, donde afirma que las horchatas poseen un efecto antígenotóxico y contribuyen a la disminución de ERO (Palacio-Arpi y Bailón-Moscoso, 2016).

CONCLUSIONES

Con base en nuestros resultados, la evidencia indica que las horchatas H1, H7 y H9 a una concentración de 1000 µg/mL generan genotoxicidad sobre leucocitos humanos, mientras que H2 no, con respecto al daño basal.

Pudimos determinar que al inducir genotoxicidad con CsA en las células, las horchatas H2, H7 y H9 en co-tratamiento actúan como agentes desmutágenos, probablemente generando mecanismos de protección, por otro lado, la horchata H1 ha demostrado en pre-tratamiento actuar como bioantimutágeno con la capacidad de disminuir significativamente el daño al ADN.

Al ser las horchatas una mezcla de varias hierbas, es complejo determinar que plantas son las que poseen el efecto antígenotóxico, o si este efecto está dado por la sinergia de todas las plantas que la componen.

RECOMENDACIONES

Los metabolitos esenciales implicados, dependerán del microambiente en el que crezcan estas plantas y del estrés al que deban sobrevivir, por lo tanto, la repetitividad de los componentes químicos y por ende de los efectos demostrados en la investigación pueden ser similares si mantenemos condiciones, como el mismo huerto orgánico o la misma temporada de recolección.

La aplicación de la técnica HPLC para separar los componentes de cada una de las plantas de las horchatas sería de gran utilidad ya que nos permitiría evidenciar analíticamente los compuestos químicos que proveen el efecto antígenotóxico y a partir de esto seleccionar las plantas para dar origen a una horchata con mayor efectividad quimiopreventiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, J., & Bailon-Moscoso, N. (2017). *Actividad genotóxica y antigenotóxica mediante el análisis de micronúcleos de las horchatas expendidas en los mercados de la ciudad de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Araujo, C. R., Posleman, S. E., & Rodríguez, L. C. (2007). Changes in the antioxidant defence system induced by Cyclosporin A. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 41(1), 35-45. Recuperado a partir de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572007000100005&lang=pt
- Arencibia, D., Rosario, L., López, Y., & Díaz, D. (2003). Las plantas, fuente de agentes antimutagénicos y quimiopreventivos, 37-51.
- Asadi-Samani, M., Bahmani, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). The chemical composition, botanical characteristic and biological activities of *Borago officinalis*: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(S1), S22-S28. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60199-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60199-1)
- Bailon-Moscoso, N., Tinitana, F., Martínez-Espinosa, R., Jaramillo-Velez, A., Palacio-Arpi, A., Aguilar-Hernandez, J., & Romero-Benavides, J. C. (2017). Cytotoxic, antioxidative, genotoxic and antigenotoxic effects of Horchata, beverage of South Ecuador. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2048-x>
- Barbosa, C. V., Muskus, C. E., Orozco, L. Y., & Pabón, A. (2017). Efecto mutagénico y genotóxico, y expresión de los genes Rad51C, Xiap, P53 y Nrf2 inducidos por extractos antipalúdicos de plantas recolectadas en el Vaupés medio, Colombia. *Biomédica*, 37(3), 378-379.
- 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. <https://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. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.08.009>
- Bernabeu, A. S., Triana, B. E. G., Casanova, A. E., & Piñeiro, J. C. G. (2002). La ciclosporina

- a y el daño oxidativo en el trasplante. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 21(3), 197-200. <https://doi.org/10.1016/j.ress.2009.01.004>
- Campistol, J. M., & Morales, J. M. (2009). Manejo de tumores tras el trasplante renal. *Nefrología*, 29, 33-45.
- Castro, R., Ramírez, V., & Cuenca, P. (2004). Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 611-621.
- Ćavar, S., & Maksimović, M. (2012). Antioxidant activity of essential oil and aqueous extract of *Pelargonium graveolens* L'Her. *Food Control*, 23(1), 263-267. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.031>
- Cossio, M., González, Y., García, J., & Prieto, E. (2004). Uso del ensayo cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta A en células sanguíneas humanas. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(3), 277-284.
- de Oliveira, J. T., Barbosa, M. C. da S., de Camargos, L. F., da Silva, I. V. G., Varotti, F. de P., da Silva, L. M., ... dos Santos, F. V. (2017). Digoxin reduces the mutagenic effects of Mitomycin C in human and rodent cell lines. *Cytotechnology*, 69(4), 699-710. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0078-3>
- Džamić, A. M., Soković, M. D., Ristić, M. S., Grujić, S. M., Mileski, K. S., & Marin, P. D. (2014). Chemical composition, antifungal and antioxidant activity of *Pelargonium graveolens* essential oil. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(3), 1-5. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40301>
- Giannuzzi, L., & Larramendy, M. (2013). Estudio de la capacidad antimutagénica del extracto acuoso de *Baccharis articulata* (Lam.) Persson.
- Halabi, M. F., & Sheikh, B. Y. (2014). Anti-Proliferative Effect and Phytochemical Analysis of *Cymbopogon citratus* Extract. *BioMed Research International*, 2014, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2014/906239>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.11.005>
- Jaramillo-Vélez, A., & Bailón-Moscoso, N. (2017). *Actividad citotóxica y mecanismos de muerte celular de distintas horchatas expandidas en los principales mercados de la*

ciudad de Loja. Universidad Técnica Particular de Loja.

- Lenzi, K., Spreafico, F., Teles, G., & Guzmán, M. (2008). Effect of Flaxseed (*Linum Usitatissimum*) on the growth of wistar rats. *Journal of Labor Research*, 35, 451. <https://doi.org/10.1007/s12122-999-1010-1>
- Lenzi, M., Malaguti, M., Cocchi, V., Hrelia, S., & Hrelia, P. (2017). *Castanea sativa* Mill. bark extract exhibits chemopreventive properties triggering extrinsic apoptotic pathway in Jurkat cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1756-6>
- Liao, W., McNutt, M. A., & Zhu, W. G. (2009). The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, 48(1), 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.016>
- Loraine, S., & José Alberto, M.-E. (2010). Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México Medicinal plants as potential agents against cancer, relevance for Mexico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.
- Martínez-González, V. (2005). Biomonitorización genotóxica de poblaciones humanas expuestas ambientalmente al arsénico.
- Martínez, I. (2009). Quimiopreención del cáncer de mama. *Revisiones en Cancer*, 16(1), 2000. <https://doi.org/10.1157/13052792>
- Montalvo, C., Pasos Nájera, F., Hernández Trujillo, R., Irachela, A., Zhao, J., Pawar, R. S., ... C., D. O. V. de. (2007). *Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes*. *Journal of Ethnopharmacology* (Vol. 53). <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200015>
- Muñoz, D., & Cuca, L. (2016). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana de Cancerología*, 20(3), 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2015.10.002>
- Murillo, G., & Mehta, R. G. (2012). Cruciferous Vegetables and Cancer Prevention. National Cancer Institute. *Nutrition and Cáncer*, 41, 17-28. Recuperado a partir de <https://www.cancer.gov/about-cancer/causes-prevention/risk/diet/cruciferous-vegetables-fact-sheet>
- 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*, 25(4), 797-803. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2266-5>

- Palacio-Arpi, M. A., & Bailón-Moscoso, N. (2016). *Actividad anti-genotóxica mediante ensayo cometa de la horchata expendida en los mercados de Loja*. Universidad Técnica Particular de Loja.
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31(2), 68-81. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-2002-2>
- Pérez De Hornedo, J., De Arriba, G., Calvino, M., Benito, S., & Parra Cid, T. (2007). La ciclosporina A origina estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en células tubulares renales. *Nefrología*, 27(5), 565-573.
- Phillips, D. H., & Arlt, V. M. (2009). Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, 1, 87-110. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8336-7_4
- Pillco, A., & Rodrigo, G. (2005). Genotoxicidad / antígenotoxicidad de *Bacharis latifolia*. *Biofarbo*.
- Pombo, L., Matulevich, J., Borrego, P., Castrillón, W., Barajas, L., & . (2016). Composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Pelargonium odoratissimum* (L) L ` Hér (Geraniaceae) chemical composition and antimicrobial activity of essential, (L), 74-83. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.18359/rfcb.1856>
- Ricco, R. A., Wagner, M. L., Reides, C. G., & Carballo, M. A. (2010). Análisis de polifenoles, actividad antioxidante y genotoxicidad en especies argentinas de *Lippia* y *Aloysia* (Verbenaceae). *Revista Blacpma*, (May 2014). Recuperado a partir de <https://www.blacpma.usach.cl/revista-numero/analisis-de-polifenoles-actividad-antioxidante-y-genotoxicidad-en-especies-argentinas>
- Ríos, K., Fuertes, C., Arroyo, J., & Ruiz, J. (2017). Efecto quimioprotector del extracto alcaloideo de *Melocactus bellavistensis* (CACTUS GLOBOSO) sobre el cáncer de colon inducido con 1,2-dimetilhidrazina en ratas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 34(1), 70. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.341.2768>
- Rios, M., Tinitana, F., Jarrín, P., Donoso, N., & Romero, J. C. (2017). "Horchata" drink in Southern Ecuador: medicinal plants and people's wellbeing. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0145-z>
- Romer, X., Venegas, T., & Pérez, A. (2014). *CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE PACIENTES CON ASTROCITOMA*. Universidad de Carabobo.

- Rueda, L., & Mitma, Y. (2016). *Correlación de los parámetros del Ensayo Cometa y dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas expuestas in vitro en la evaluación del daño al ADN*, Lima 2016. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Ruiz-Pérez, N. J., Arriaga-Alba, M., Sánchez-Navarrete, J., Camacho-Carranza, R., Hernández-Ojeda, S., & Espinosa-Aguirre, J. J. (2014). Mutagenic and antimutagenic effects of *Heterotheca inuloides*. *Scientific Reports*, 4(Figure 1), 4-9. <https://doi.org/10.1038/srep06743>
- Saz-Peiró, P., & Tejero, M. C. (2016). Fitoterapia en la prevención y tratamiento del cancer. *Medicina Naturista*, 10(2), 88-99.
- Scovassi, I., & Guamán, L. M. (2013). Traditional Medicine: An Ancient Remedy Rediscovered. *Biochemistry & Pharmacology*, 02(1), 2-4. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000110>
- Silva-Alvarado, C. (2005). *Medicamentos de riesgo en el ámbito ocupacional*. Universidad de Chile.
- Solis, C. (2014). *Experiencias en la producción comercial de Hierba Mora*. Universidad Rafael Landívar.
- Steward, W. P., & Brown, K. (2013). Cancer chemoprevention: A rapidly evolving field. *British Journal of Cancer*, 109(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.280>
- Surh, Y.-J. (2003). Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 768-780. <https://doi.org/10.1038/nrc1189>
- Tinitana, F. (2014). «*Composición florística y etnobotánica de las diferentes formaciones vegetales de la provincia de Loja, Ecuador*». Universidad Politécnica de Madrid.
- Tomás-Barberán, F. (2003). Los polifenoles de los alimentos y la salud. *ALIMENTACION, NUTRICION Y SALUD*, 10, 41-53.
- Torres, G., Gil, D., Cano, Á., & Sosa, Y. (2010). Evaluación de la capacidad antioxidante de la quercetina a partir del extracto natural de cebolla roja ocañera (*Allium cepa* L) y manzana roja (*Pyrus malus* L var. red delicious) en aceite de palma refinado tipo industrial. *Revista Publicaciones e Investigación*, 4.
- Trimachi, H. (2014). Mecanismos de acción de la drogas inmunosupresoras empleadas en las glomerulopatías y en el transplante.
- Vanini, M., Barbieri, R., Heck, R., & Schwartz, E. (2011). Uso de plantas medicinales por pacientes oncológicos y familiares en un centro de radioterapia. *Enfermería Global*, (21),

1-6. <https://doi.org/10.4321/S1695-61412011000100006>

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. *Toxicology Letters*, 152(1), 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.002>

World Health Organization. (2012). Cancer. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

National Institutes of Health (2015). Causas de cáncer. Recuperado de: <https://www.cancer.gov/espanol/investigacion/areas/causas>

ANEXOS

Anexo 1. Plantas que componen los liofilizados de horchatas en estudio

Familia	Especie	Nombre comun	H1	H2	H7	H9
Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Albahaca blanca		✓		
Brassicaceae	<i>Mathiola incana</i> (L.) R. Br.	Alelias	✓		✓	
Amaranthaceae	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Ataco		✓		✓
Borraginaceae	<i>Borago officinalis</i>	Borraja				✓
Tiliaceae	<i>Triumfetta althaeoides</i> Lam.	Cadillo	✓	✓	✓	
Verbenaceae	<i>Aloysia triphylla</i> (L'Her.) Britton	Cedrón		✓		✓
Cariophyllaceae	<i>Dinathus caryophyllus</i>	Clavel			✓	
Equisetaceae	<i>Equisetum bogotense</i> Kunth	Cola caballo	✓	✓	✓	
Piperaceae	<i>Peperomia inaequalifolia</i> Ruiz & Pav.	Congona grande			✓	
Amaranthaceae	<i>Iresine herbstii</i> Hook.	Escancel	✓	✓	✓	✓
Geraniaceae	<i>Pelargonium odoratissimum</i>	Esencia de rosa			✓	
Poaceae	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf	hierba luisa	✓		✓	✓
Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i> . P. Mill	Hinojo		✓	✓	
Linnaceae	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Linasa		✓	✓	✓
Plantaginaceae	<i>Plantago major</i> L.	Llanten	✓	✓	✓	
Malvaceae	<i>lavatera arborea</i>	Malva blanca grande	✓	✓		✓
Malvaceae	<i>Malva parviflora</i> L.	Malva coche rosada			✓	
Geraniaceae	<i>Pelargonium graveolens</i> L'Herit.	Malva olorosa (grande)	✓	✓	✓	✓
Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i> L.	Manzanilla	✓			✓
Lamiaceae	<i>Mentha spicata</i> L.	Menta, hierba buena pubescente				✓
Lamiaceae	<i>Mentha x piperita</i> L.	Menta, menta negra (casa)			✓	✓
Solanaceae	<i>Solanum americanum</i> Mill.	Mortiño	✓			✓
Onagraceae	<i>Fuchsia magellanica</i> Lam	Pena pena blanca morada simple	✓	✓	✓	
Onagraceae	<i>Fuchsia hypoleuca</i> Hort.	Pena pena blanca rosada	✓	✓	✓	
Onagraceae	<i>Fuchsia hybrida</i>	Pena pena grande			✓	
Rosaceae	<i>Rosa canina</i>	Rosa simple rosada blanca	✓		✓	
Onagraceae	<i>Oenothera rosea</i> L'Her. ex Aiton.	Shullo	✓		✓	
Adoxaceae	<i>Sambucus nigra</i> L.	Tilo	✓			
Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i> L.	Torongil	✓	✓		

Fuente: Dr. Juan Carlos Romero Benavides

Elaboración: Autor