



**UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA**  
*La Universidad Católica de Loja*

**ÁREA BIOLÓGICA Y BIOMÉDICA**  
**BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

TRABAJO DE TITULACIÓN

Genotoxicidad de extractos de *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia* en células CHO K-1

**Autora:** Alvarez Ruiz, Andrea del Cisne

**Directora:** Bailón Moscoso, Natalia Catalina

LOJA – ECUADOR

2020



*Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NC-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>*

2020

## Aprobación del director del Trabajo de Titulación

Loja, 17 de noviembre de 2020

Mgtr.

Claudia Teresa Cruz Erazo

Coordinadora de Titulación

Ciudad. -

De mi consideración:

El presente Trabajo de Titulación denominado: Genotoxicidad de extractos de *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia* en células CHO K-1, realizado por Andrea del Cisne Alvarez Ruiz, ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo. Así mismo, doy fe que dicho Trabajo de Titulación ha sido revisado por la herramienta antiplagio institucional. Particular que comunico para los fines pertinentes.

Atentamente,

Firma: \_\_\_\_\_

Natalia Catalina Bailón Moscoso

C.I.:

### Declaración de autoría y cesión de derechos

“Yo, Andrea del Cisne Alvarez Ruiz, declaro y acepto en forma expresa lo siguiente:

- Ser autora del Trabajo de Titulación denominado: Genotoxicidad de extractos de *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia* en células CHO K-1, de la Titulación de Bioquímica y Farmacia, específicamente de los contenidos comprendidos en: Introducción, Capítulo 1. Marco teórico, Capítulo 2. Fin del proyecto, Capítulo 3. Materiales y métodos, Capítulo 4 Resultados, Capítulo 5. Discusión, Conclusiones y Recomendaciones, siendo Ph.D Natalia Catalina Bailón Moscoso, directora del presente trabajo; y, en tal virtud, eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones judiciales o administrativas, en relación a la propiedad intelectual. Además, ratifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo son de mi exclusiva responsabilidad.
- Que mi obra, producto de mis actividades académicas y de investigación, forma parte del patrimonio de la Universidad Técnica Particular de Loja, de conformidad con el artículo 20, literal j), de la Ley Orgánica de Educación Superior; y, artículo 91 del Estatuto Orgánico de la UTPL, que establece: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.
- Autorizo a la Universidad Técnica Particular de Loja para que pueda hacer uso de mi obra con fines netamente académicos, ya sea de forma impresa, digital y/o electrónica o por cualquier medio conocido o por conocerse, sirviendo el presente instrumento como la fe de mi completo consentimiento; y, para que sea ingresada al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, en cumplimiento del artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma: \_\_\_\_\_

Autora: Andrea del Cisne Alvarez Ruiz

C.I.: 1150562799

### **Dedicatoria**

A Dios y la Virgen de El Cisne, por bendecir mi vida y darme la fortaleza necesaria en mis tiempos de debilidad.

A mi madre, mi compañera y pilar fundamental en mi vida, por su gran amor y entrega incondicional, que me han permitido lograr cada una de mis metas.

A mi padre, por su apoyo, motivación y consejos para seguir adelante.

A mi familia, amigos y todas las personas que creyeron en mí, por ser un apoyo indispensable en cada etapa de mi vida y brindarme una palabra de aliento en los momentos que más necesitaba.

Andrea del Cisne

## **Agradecimiento**

La educación nos regala la llave del éxito para el futuro y el final de una etapa académica es el inicio de nuevas oportunidades, es por ello que, agradezco a Dios y a la Virgen de El Cisne, por iluminar mi espíritu para la culminación de este trabajo de investigación.

Mi más sincero e infinito agradecimiento a mis padres: Angelita, por brindarme su incondicional amor y apoyo e inspirarme con su ejemplo de perseverancia, a los que debo todo lo que soy. Jorge, por su amor, sus consejos y soporte a lo largo de esta etapa.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, Titulación de Bioquímica y Farmacia, por ofrecerme una educación de alto nivel y por su apoyo a la investigación.

A la Ph.D. Natalia Bailón, directora de este trabajo de investigación, por su asesoría, paciencia y apoyo en el desarrollo del mismo, por haberme permitido ser parte del Laboratorio de Biología Celular y Genotoxicología y brindarme sus enseñanzas.

Al Ph.D. Luis Miguel Guamán y Mgtr. María Isabel Ramírez, por compartir conmigo sus conocimientos, enseñanzas y consejos a lo largo de este proceso.

A mis compañeros de laboratorio, por ser un gran equipo de trabajo.

A mis amigos de toda la vida y a aquellos que conocí en esta etapa universitaria, por brindarme su cariño, apoyo y por ser partícipes de infinitas experiencias.

## Índice de Contenido

Aprobación del director del Trabajo de Titulación .....	II
Declaración de autoría y cesión de derechos.....	III
Dedicatoria.....	V
Agradecimiento.....	VI
Índice de Contenido.....	VII
Índice de Tablas .....	X
Índice de Figuras .....	X
Lista de Abreviaturas.....	XI
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción .....	3
Capítulo 1. Marco teórico .....	5
1.1 Genotoxicología .....	5
1.1.1 Genotoxicidad.....	5
1.1.2 Mutagénesis.....	6
1.1.3 Carcinogénesis .....	6
1.1.4 Teratogénesis .....	7
1.1.5 Mecanismos de daño al ADN.....	8
1.2 Evaluación genotóxica: Biomarcadores .....	14
1.2.1 Ensayo Cometa .....	15
1.2.2 Cultivos celulares: Línea celular Chinese Hamster Ovary (CHO K-1) .....	17
1.3 Medicina tradicional .....	18

1.3.1 Productos naturales y genotoxicidad .....	19
Capítulo 2. Fin del proyecto .....	25
2.1 Objetivo General.....	25
2.2 Objetivos específicos.....	25
Capítulo 3. Materiales y métodos.....	26
3.1 Material de estudio .....	26
3.2 Modelo biológico y cultivo celular .....	27
3.3 Tratamiento.....	27
3.4 Cosecha celular .....	27
3.5 Ensayo de viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio.....	28
3.6 Ensayo cometa .....	28
3.6.1 Preparación y montaje de las placas .....	28
3.6.2 Lisis celular .....	28
3.6.3 Electroforesis y fijación de placas .....	29
3.6.4 Lectura de cometas .....	29
3.7 Análisis estadístico .....	29
3.7.1 Resultados de viabilidad por FDA – Bromuro de Etidio. ....	29
3.7.2 Resultados del ensayo cometa. ....	29
Capítulo 4. Resultados .....	31
4.1 Viabilidad de la línea celular CHO K-1 expuesta a diferentes extractos de <i>Geranium diffusum</i> , <i>Bauhinia tarapotensis</i> , <i>Tragia volubilis</i> y <i>Picramnia magnifolia</i> .....	31
4.2 Genotoxicidad de la línea celular CHO K-1 expuesta a diferentes extractos de <i>Geranium diffusum</i> , <i>Bauhinia tarapotensis</i> , <i>Tragia volubilis</i> y <i>Picramnia magnifolia</i> .....	32
4.2.1 Longitud de cola .....	32

Capítulo 5. Discusión.....	35
Recomendaciones.....	44
Referencias.....	45

### Índice de Tablas

Tabla 1 <i>Características de las especies estudiadas</i> .....	21
Tabla 2 <i>Metabolitos secundarios o compuestos bioactivos presentes en el género o familia de las especies estudiadas</i> .....	23
Tabla 3 <i>Detalle de extractos utilizados</i> .....	26

### Índice de Figuras

Figura 1 <i>Vista general de algunos mecanismos de acción de los genotóxicos sobre el ADN</i> .....	9
Figura 2 <i>Tipos de daños al ADN</i> .....	13
Figura 3 <i>Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio</i> .....	31
Figura 4 <i>Longitud de cola</i> .....	32

### Lista de Abreviaturas

AcOEt: Acetato de etilo

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

BER: (Base Excision Repair) Sistema de reparación por escisión de bases

BuOH: Butanol

CHO K-1: (Chinese Hamster Ovary) Línea celular de ovario de hámster chino

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

CPD: Dímeros de ciclobutano-pirimidina

DCM: Diclorometano

DMSO: Dimetil sulfóxido

DSB: (Double Strand-breaks) Roturas de cadena doble

DSBR: (Double Strand-breaks Repair) Vía de reparación de roturas de cadena doble

ED<sub>50</sub>: Dosis efectiva

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EMA: (European Medicines Agency) Agencia Europea de Medicamentos

EMS. Etil metano sulfonato

EPA: Agencia de Protección Ambiental

EtOH: Etanol

FDA: (Food and Drug Administration) Agencia de Administración de Medicamentos y alimentos.

FDA: (Fluorescein diacetate) Diacetato de fluoresceína

H 33342: Fluorocromo Bisbenzimidaz

H2AX: Histona H2AX

H<sub>2</sub>O: Agua

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno

HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

HCT-116: Línea celular de cáncer colorrectal de tipo salvaje

HUVEC: Células endoteliales de la vena umbilical humana

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria media máxima

ICL: (Interstrand Crosslink) Reparación de los entrecruzamientos entre cadenas

LMP: (Low melting point) Agarosa de bajo punto de fusión

LNCaP: Línea celular de cáncer de próstata dependiente de hormonas

Lu1: Línea celular de cáncer de pulmón

MCF-7: Línea celular de carcinoma de mama

MeOH: Metanol

MMR: (Mismatch Repair) Sistema de reparación de incompatibilidad

MMS: Metil metano sulfonato

MNNG: Metil-nitro-nitrosoguanidina

MNU: N-metil-nitrosourea

NAD<sup>+</sup>: Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado

NaOH: Hidróxido de sodio

NMRI: Células de médula ósea de ratón

NER: (Nucleotide Excision Repair) Reparación por escisión de nucleótidos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PARP-1: Poli (ADP-ribosa) polimerasa-1

PF. Fracción final

PP: Fotoproductos de pirimidina

RKO. Línea celular de cáncer colorrectal

ROS: (Reactive Oxygen Species) Especies Reactivas de Oxígeno

SFB: Suero fetal bovino

SSB: (Simple Strand-breaks) Roturas de ADN de cadena simple

SSBR: (Simple Strand-breaks Repair) Vía de reparación de roturas de cadena simple

SW613-B3: Línea celular de cáncer colorrectal con p53 mutado

TOP1: Topoisomerasa 1

U-937: Línea celular derivada de linfoma histiocítico

UV: Ultravioleta

V79: Línea celular de pulmón de hámster chino

XRCC1: Proteína de reparación de ADN XRCC1

## Resumen

Los productos naturales y la medicina, han permanecido tradicionalmente vinculados debido al uso de plantas medicinales, basado en conocimientos empíricos de culturas ancestrales. Aun cuando las plantas poseen numerosos efectos terapéuticos, su composición química abarca diversas sustancias, algunos de los cuales, pueden causar efectos adversos en el organismo. Debido a la creciente tendencia de la población al consumir este tipo de especies, se considera de vital importancia evaluar la genotoxicidad de los mismos; es decir, su capacidad de interaccionar o producir daño en el material genético. Por ello, la presente investigación se enfocó en la evaluación de la genotoxicidad de extractos y fracciones de las especies *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia* sobre la línea celular CHO K-1, mediante parámetro longitud de cola del ensayo cometa. Los resultados demostraron que los extractos BtMeOHt, TvH<sub>2</sub>O, PmEP, PmDCM, y las fracciones GdMeOH.Hex, GdMeOH.DCM, GdMeOH.AcOEt, BtAcOEt, BtMeOH, TvH<sub>2</sub>O.DCM y TvH<sub>2</sub>O.BuOH, presentaron actividad genotóxica sobre la línea celular empleada a la dosis probada.

*Palabras claves:* Genotoxicidad, Ensayo cometa, Plantas medicinales.

### Abstract

Natural products and medicine have traditionally remained linked due to the use of medicinal plants, based on empirical knowledge of ancestral cultures. Even though plants have many therapeutic effects, its chemical composition includes various substances, some of which can cause adverse effects in the body. Due to the growing tendency of the population to ingest this type of species, it is considered essential the assessment of the genotoxicity, that is, its ability to interact or cause damage to genetic material. Therefore, the present investigation focused on the evaluation of the genotoxicity of extracts and fractions of the species *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis*, and *Picramnia magnifolia* in CHO K-1 cell line, using the tail length parameter of the comet assay. The results revealed that the extracts BtMeOHt, TvH<sub>2</sub>O, PmEP, PmDCM, and the fractions GdMeOH.Hex, GdMeOH.DCM, GdMeOH.AcOEt, BtAcOEt, BtMeOH, TvH<sub>2</sub>O.DCM and TvH<sub>2</sub>O.BuOH, exhibited a genotoxic effect in CHO K-1 cells at the dose tested.

Keywords: Genotoxicity, Comet assay, Medicinal plants.

## Introducción

Desde la antigüedad las personas han recurrido a la naturaleza, principalmente a las plantas, como recurso medicinal para aliviar sus dolencias. Tradicionalmente el uso de las plantas medicinales ha estado basado en conocimientos empíricos de culturas ancestrales. Dichos conocimientos han sido transmitidos de generación en generación, es así que, en la actualidad se estima que aproximadamente el 80% de la población mundial, ha empleado la medicina tradicional para enfrentar necesidades primarias de asistencia médica (Bautista, 2010).

En algunos países de la región Andina y Amazónica de Latinoamérica, incluyendo Ecuador, existe una gran biodiversidad de especies con usos medicinales, viéndose incrementada la demanda en el comercio de las mismas. Debido a la elevada acogida de la población por alternativas curativas naturales, se ha acrecentado el interés por indagar en la composición química de la extensa variedad de especies que posee nuestro país, desarrollándose diversos estudios con enfoque etnobotánico y fitoquímico. A pesar de ello, tan solo un porcentaje pequeño de plantas han sido estudiadas, evidenciando así la necesidad de incrementar investigaciones de carácter etnobotánico y etnofarmacológico, que nos permitan conocer la estructura química de dichas especies y entender la relación con su uso para aliviar diversos desórdenes de salud (Tinitana et al., 2016). Adicionalmente, para establecer la seguridad de los productos naturales que consumimos, se debe considerar de vital importancia evaluar la toxicidad de los mismos, ya que se ha demostrado que ésta no solamente es una propiedad intrínseca de ciertas sustancias artificiales. Dentro de la composición química de las plantas se pueden encontrar diversos compuestos, algunos de los cuales, pudiesen causar efectos adversos en el organismo, incluyendo daños citotóxicos, genotóxicos, entre otros.

La genotoxicidad se define como el daño en el material genético de una célula, producido por un agente físico, químico o biológico, existen diversos biomarcadores de genotoxicidad, entre los cuales, el ensayo cometa es uno de los más utilizados para detectarla (Bautista, 2010). Pese a lo anteriormente mencionado, Cabrera (2010) afirma que: “un

número limitado de plantas, particularmente de relevancia médica, han sido estudiadas por sus posibles propiedades citotóxicas y genotóxicas” (p. XXVI), considerando necesarios estudios adicionales para evaluar el daño al ADN, además de actividades reparadoras del mismo, por las plantas y sus derivados. Las especies *Geranium diffusum* (Kunth), *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia Volubilis* y *Picramnia magnifolia*, se encuentran en nuestro país. Dado el uso medicinal de las especies previamente señaladas en nuestra la población y tomando en cuenta la relevancia de aportar información sobre éstas, el presente trabajo de investigación, se encaminó a evaluar la genotoxicidad de diferentes extractos de dichas especies, sobre la línea celular CHO K-1 (células de ovario de hámster chino), mediante el ensayo cometa.

## Capítulo 1. Marco teórico

### 1.1 Genotoxicología

Según Repetto-Jiménez & Repetto-Kuhn (2009):

La genotoxicología comprende el estudio de la acción de los tóxicos sobre los componentes hereditarios de los seres vivos; consecuentemente, genotóxicos son los agentes físicos (temperatura, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, radiaciones electromagnéticas, etc.) o los productos químicos capaces de alterar la información genética celular. (p. 329)

Ésta es una ciencia de investigación aplicada, que incorpora principios de diferentes campos de la genética, la microbiología, la biología celular y molecular, la bioquímica y la toxicología (Mitchell, 2004), además identifica y analiza los efectos que derivan de la exposición a sustancias tóxicas sobre el material genético de los organismos vivos, al mismo tiempo que pretende descubrir sus posibles mecanismos de acción y consecuencias a nivel de la patología humana, tales como la carcinogénesis, teratogénesis y recarga genética de alelos deletéreos (Guachalla y Ascarrunz, 2003; Ostrosky Wegman y Gonzebatt, 1997). En este contexto, la genotoxicología también plantea el conocimiento de los efectos de dichas sustancias sobre las especies vegetales y animales, puesto que afectaciones al ecosistema pudiesen derivar en afectaciones a la salud humana (Ostrosky Wegman y Gonzebatt, 1997).

#### 1.1.1 Genotoxicidad

Genotoxicidad se define como el efecto producido en la célula por acción de las moléculas de origen mutágenos (genotoxinas), que destruyen el material genético e inducen mutaciones en el ADN. Abarcando como genotóxicos a dichos agentes con capacidad para interaccionar tanto directa como indirectamente con en el ADN e interferir en algunos procesos enzimáticos de la reparación, génesis o polimerización del material proteico involucrado en la segregación cromosómica (Bustamante, 2018; González, 2009).

La mutación provocada por un agente genotóxico, supone un cambio en la información contenida en el material genético, el cual puede ser transmitido a la descendencia o afectar a células u órganos propios del individuo, alterando los procesos metabólicos de la célula y

desencadenando en eventos tales como la recarga genética de alelos deletéreos, carcinogénesis o teratogénesis (Guachalla y Ascarrunz, 2003; Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009).

### **1.1.2 Mutagénesis**

Se define mutagénesis como una modificación estable y transmisible del material genético; pudiendo ser de dos tipos: microlesión/mutación puntual (transición, transversión, delección de unas pocas bases, corrimiento del marco de lectura) o macrolesión, también conocida como aberración o rearreglo cromosómico (Martinez Montaña, 2003; Mudry y Carballo, 2006). Dicha mutación posee capacidad de originar cambios hereditarios de célula a célula (entre las somáticas) o de un organismo a sus descendientes por afectación de las células germinales (Martinez Montaña, 2003; Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009). Los compuestos de tipo mutagénicos, carcinógenos y/o teratógenos son considerados e identificados como agentes genotóxicos de diferente alcance (Martinez Montaña, 2003).

Se estima que la mayoría de los compuestos exhiben un umbral de toxicidad, induciendo efectos sistémicos únicamente si se sobrepasa una determinada dosis; por el contrario, existe un grupo de compuestos que incluye a los cancerígenos genotóxicos o mutagénicos, cuyas dosis por pequeñas que sean, pueden dar lugar a efectos tóxicos. Luego de que el ADN de la célula ha sido afectado por un agente de este tipo, existen tres posibilidades:

- a) La lesión del ADN impide la replicación por lo que la célula muere por apoptosis.
- b) Replicación de la célula con alteraciones en los nucleótidos o errores en la replicación del ADN dañado, por lo tanto, se transmite la mutación.
- c) Reparación del daño y restauración de la molécula de ADN, se sorteó la mutación (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009).

### **1.1.3 Carcinogénesis**

Algunos autores han afirmado que carcinogénesis:

Es la pérdida de la capacidad de la célula para controlar su reproducción, generalmente por la acumulación sucesiva de mutaciones con deterioro del genoma, en que

la secuencia genómica normal (protooncogenes) se altera, activándose los oncogenes, que estimulan la proliferación celular, al propio tiempo que se inactivan los genes que inhiben la proliferación (llamados genes supresores de tumores) (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009).

Aquellos agentes físicos, químicos o biológicos capaces de aumentar la frecuencia de aparición de neoplasias malignas, son considerados como carcinógenos, mismos que actúan a dosis bajas (subtóxicas) (González, 2009), pero recibidas de forma reiterada. Muchos de éstos agentes de origen químico requieren una activación metabólica para expresar su potencial carcinogénico. Los efectos producidos pueden deberse a procesos endógenos (alteraciones en el ADN, cambio de ciertas bases o ataque de compuestos electrófilos y radicales activos generados en los procesos metabólicos); y por procesos exógenos (radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioletas y/o carcinógenos químicos) (De la Peña de Torres y Cols, 2012; Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009).

En la carcinogénesis química se pueden distinguir tres etapas: iniciación, promoción y progresión. La iniciación abarca la alteración de cualquiera de los tres procesos fundamentales para la reproducción celular: metabolismo, reparación del ADN y proliferación. La promoción consiste en la reproducción selectiva de las células portadoras de mutaciones con alteración en la transducción, es de carácter reversible por fenómenos de apoptosis y depende de factores fisiológicos, (envejecimiento, dieta y factores hormonales). La progresión es la pérdida del control en la replicación de las células en estado normal y su conversión en células neoplásicas o malignas (De la Peña de Torres y Cols, 2012). Este último proceso, también denominado cáncer, abarca un amplio grupo de enfermedades y puede afectar a cualquier parte del organismo, se difunde e infiltra en otros lugares del cuerpo, mediante un proceso conocido como "metástasis" (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018a).

#### **1.1.4 Teratogénesis**

Los agentes genotóxicos pueden ser de carácter teratogénico al producir malformaciones fetales, los efectos ocasionados dependen del momento de absorción del tóxico en las mujeres embarazadas, siendo el periodo embrionario el más susceptible. De

esta forma, en el periodo preconcepcional, se afectan los gametos y se dificulta la reproducción; en el periodo concepcional, se interfiere en la fertilización mientras que en el periodo postconcepcional las afectaciones se dan sobre el cigoto (problemas de implantación, muerte y expulsión del cigoto), sobre el embrión (alteración de la organogénesis = teratogénesis), sobre el feto (intoxicación del feto que entorpece su maduración y crecimiento) (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009).

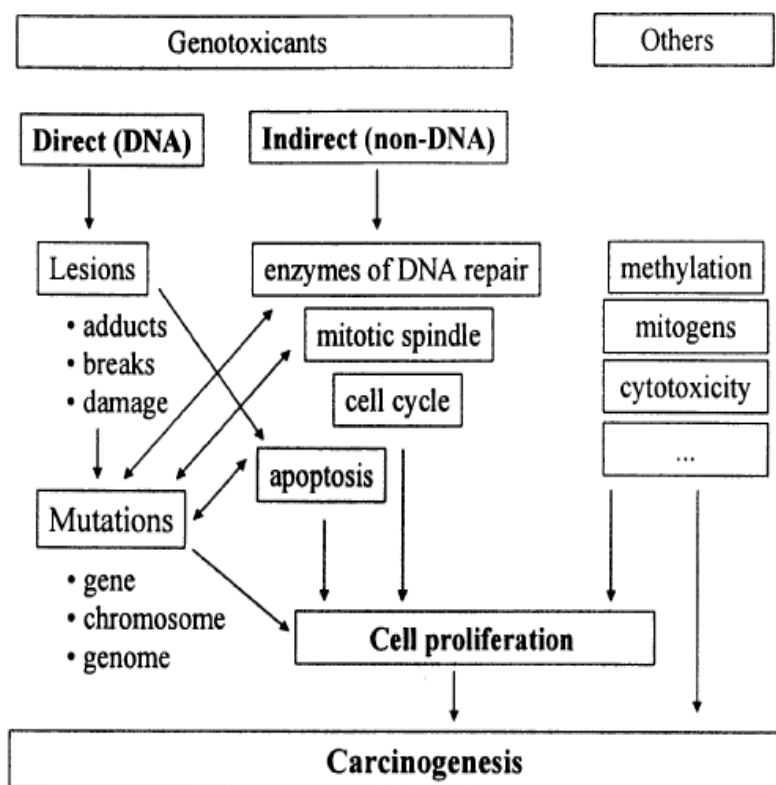
### **1.1.5 Mecanismos de daño al ADN**

El material genético se encuentra constantemente expuesto directa o indirectamente a diferentes agentes físicos, químicos o biológicos, que pueden ser derivados del ambiente (exógenos) o de procesos metabólicos que ocurren continuamente dentro de la célula (endógenos) (Durant, 2017). Los genotóxicos son compuestos electrófilos muy reactivos, ciertas sustancias antes de adquirir su capacidad genotóxica necesitan ser metabolizadas, esto implica cambios a nivel del ADN o sus constituyentes, proteínas encargadas del mantenimiento de la integridad genómica como son las tubulinas, enzimas de reparación, o proteínas destinadas al control del ciclo celular (Kirsch-Volders et al., 2003; Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009).

El daño al ADN puede surgir de una variedad de lesiones, que incluyen roturas de cadena simple y doble en la estructura principal de fosfato-desoxirribosa, enlaces covalentes cruzados entre bases de ADN y proteínas, y adición de aductos a las bases de ADN – adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T) (Mitchell, 2004), cabe mencionar que los agentes alquilantes y las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés *Reactive Oxygen Species*), forman una mayor diversidad de derivados con las bases, que las aminas aromáticas y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Las lesiones causadas por estos compuestos pueden ser eliminadas por las proteínas reparadoras de ADN o persistir a dicho mecanismo, produciendo una mutación y desencadenando en otros procesos (Figura 1) (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009).

**Figura 1**

Vista general de algunos mecanismos de acción de los genotóxicos sobre el ADN.



Nota. Adaptado de *Indirect mechanisms of genotoxicity* (p. 64), por M. Kirsch-Volders et al., 2003, *Toxicology Letters*, 140 – 141.

Existen diferentes tipos de daños al ADN (Figura 2), entre ellos cabe destacar los que se detallan a continuación:

### **Aductos voluminosos en el ADN.**

Después de haber pasado por activación metabólica, algunos compuestos genotóxicos interactúan con el ADN desencadenando la formación de aductos de ADN (Mitchell, 2004) y la activación transcripcional de genes que regulan la reparación del ADN, la supervivencia celular y la viabilidad (Lansdown, 2014). Estos pueden ser ocasionados por interacciones con: radiación ultravioleta (UV), causando enlaces covalentes entre dos pirimidinas adyacentes cuyos fotoproductos principales son dímeros de ciclobutano-pirimidina (CPD), 6–4 fotoproductos de pirimidina [(6–4) PP] y los minoritarios son hidrato de pirimidina, glicoles de timina y aductos de dipurina, su frecuencia de formación depende de la longitud

de onda y dosis de luz (Chatterjee y Walker, 2017); HAP, asociados con el tabaquismo y la exposición a productos de combustión, dando como resultado predominantemente la transversión de G a T (Basu, 2018; Knudsen y Merlo, 2012); antibióticos como la mitomicina C y la adriamicina, inducen enlaces cruzados entre ADN/proteína y ADN-ADN, entre cadenas que unen covalentemente las bases de nucleótidos en una/ambas cadenas de ADN, respectivamente; cisplatino y camptotecina, clasifican como agentes que generan entrecruzamientos de ADN, en el caso del cisplatino, enlaces cruzados intra-cadena (Figura 2). Los aductos voluminosos generalmente se eliminan mediante el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair*, NER), el cual elimina el tramo de ADN que alberga la lesión (típicamente unas 30 bases de largo) y lo reemplaza con la secuencia correcta de bases de nucleótidos (Durant, 2017).

Los aductos de ADN pueden proporcionar un enlace cuantitativo de la dosis biológicamente efectiva de un genotóxico/carcinógeno en el tejido que se examina, si bien tienen un alto potencial como marcador de exposición relevante en la evaluación del riesgo de cáncer en comparación con otros biomarcadores (Knudsen y Merlo, 2012; Mitchell, 2004), su presencia no puede interpretarse en términos de evaluación de riesgos para la salud sin datos adicionales sobre las relaciones dosis-respuesta (Knudsen y Merlo, 2012).

### **Daño en las bases de nucleótidos.**

Ocasionado por factores ambientales o endógenos, al inducir pequeñas alteraciones químicas en las bases que codifican la secuencia de ADN: G, C, T y A, pero que pueden tener efectos drásticos sobre la integridad de la secuencia genética a lo largo del tramo de ADN que alberga dicho daño. Entre los factores que lo causan se encuentran:

- Daño oxidativo, mayormente causado por ROS, las cuales se encuentran en el núcleo, citoplasma o mitocondrias y se producen durante los procesos metabólicos celulares normales, la forma más común de daño en la base que generan es la conversión de guanina a 8-oxoguanina (Figura 2) (Durant, 2017). Las ROS más sobresalientes son los radicales superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), siendo éste último el más reactivo y capaz de dañar el ADN, las proteínas y los

lípidos. Dichas especies en exceso pueden causar aproximadamente 100 diferentes lesiones de base oxidativa y modificaciones de 2-desoxirribosa, asociándose notablemente con el desarrollo de enfermedades humanas como el cáncer, Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la diabetes y la insuficiencia cardíaca (Chatterjee y Walker, 2017).

Otras sustancias químicas como el cloruro de vinilo y cromo también pueden oxidar las bases de nucleótidos. Antioxidantes como el ácido úrico circulante, la enzima superóxido dismutasa y los que se proporcionan la vitamina C (ácido ascórbico) y la curcumina, trabajan para absorber los radicales libres que pueden oxidar el ADN y generalmente se consideran agentes importantes que protegen las células de los oxidantes (Durant, 2017). El sistema de reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés *Base Excision Repair*) es el encargado de reparar este tipo de daño (Chatterjee y Walker, 2017).

- Agentes alquilantes, producidos principalmente a partir de componentes dietéticos, humo de tabaco, quema de biomasa, procesamiento industrial y agentes quimioterapéuticos, reaccionan con mayor afinidad con los nitrógenos de las bases altamente nucleófilos al agregar el grupo alquilo (etilo o metilo), especialmente en el N7 de guanina y N3 de adenina, y un poco menos con los oxígenos.

Los ejemplos de bases de ADN aducidas incluyen adenina modificada (en N1, N3, N<sup>6</sup> y N7), guanina (N1, N<sup>2</sup>, N3, N7 y O<sup>6</sup>), citosina (N3, N<sup>4</sup> y O<sup>2</sup>), timina (N3, O<sup>2</sup>, y O<sup>4</sup>) y fosfatos de alquilo en la cadena principal del ADN (las posiciones exocíclicas de las bases de ADN se indican con superíndice en cursiva). Los agentes alquilantes más comunes usados en los laboratorios incluyen metil metano sulfonato (MMS), que produce N7-metilguanina y N3-metiladenina mutagénicas; etil metano sulfonato (EMS), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) y N-metil-nitrosourea (MNU) que producen O<sup>6</sup>-metilguanina (Figura 2), que se empareja incorrectamente con T e induce mutaciones G:C → A:T Otros ejemplos de agentes alquilantes son la ciclofosfamida,

las mostazas de azufre y nitrógeno. La reversión del daño directo, la *BER* y la reparación de los entrecruzamientos entre cadenas (ICL, por sus siglas en inglés, *Interstrand Crosslink*) son las vías de reparación de las bases alquiladas (Chatterjee y Walker, 2017).

- Bases incompatibles, ocasionadas por lesiones metiladas no reparadas las cuales están sujetas a reparación secundaria por el sistema de reparación de incompatibilidad (MMR, por sus siglas en inglés, *Mismatch Repair*) que normalmente funciona para reemplazar la base no coincidente ocasional con su pareja correcta (A con T y C con G). Al hacerlo, el sistema de reparación puede ser "engañado" por el cambio estructural ejercido por la metilación y, si no se envía alrededor de un ciclo inútil de reparación tóxica, puede promover la fijación de mutaciones potencialmente cancerígenas (Durant, 2017).

#### **Roturas de simple o doble cadena.**

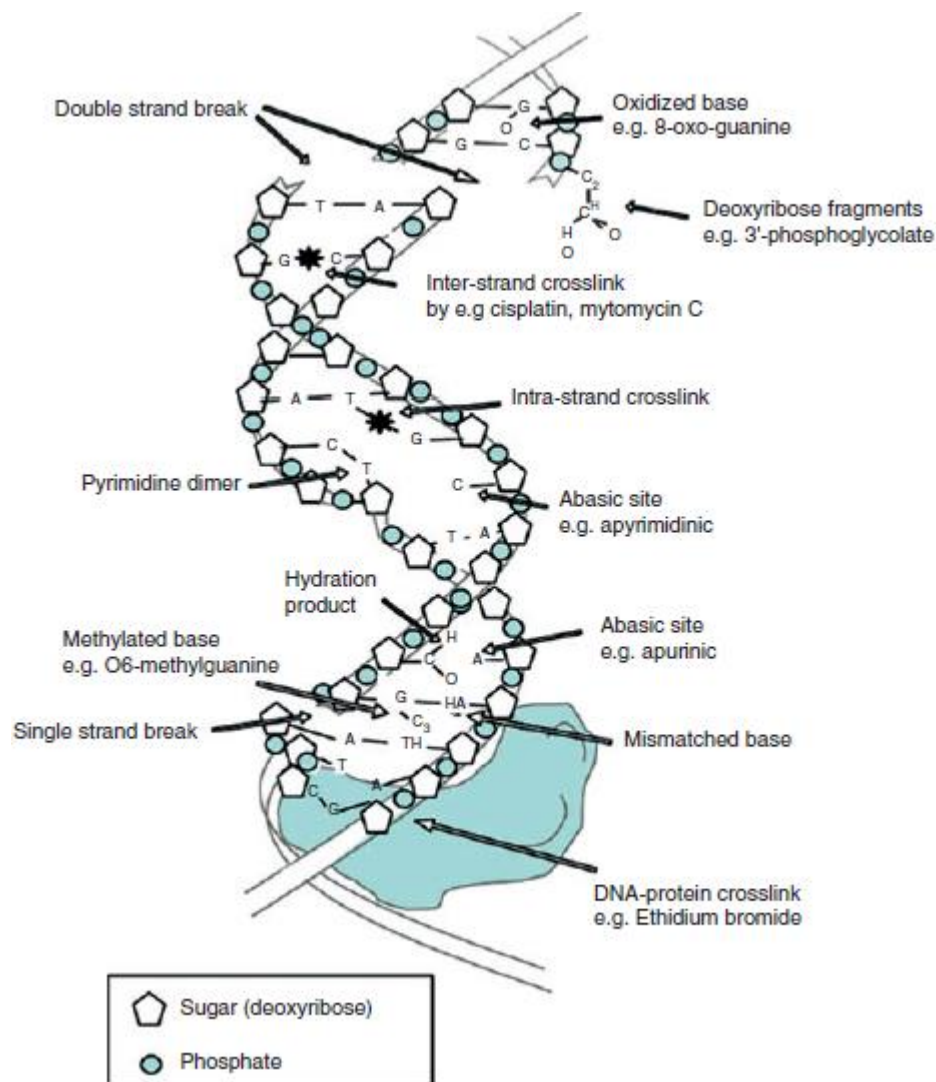
Los agentes que dañan el ADN, como la radiación ionizante (rayos X, partículas  $\alpha$  y  $\beta$ ) y los radicales libres pueden romper físicamente los enlaces covalentes entre los fosfatos, la ribosa y las bases y provocar roturas de ADN de cadena simple y doble (SSB, por sus siglas en inglés *Simple Strand-breaks* y DSB, por sus siglas en inglés *Double Strand-breaks*) (Figura 2); dichos daños en la estructura del ADN son reparados por las vías de reparación SSB (SSBR) o las vías de reparación de rotura de doble cadena (DSBR) (Chatterjee y Walker, 2017; Durant, 2017).

Las SSB a menudo se generan a partir del daño oxidativo del ADN, de sitios abásicos o de la actividad errónea de la enzima ADN topoisomerasa 1 (TOP1), las ROS pueden comprometer el esqueleto del ADN causando un estimado de 2 300 SSB por célula por hora en células de mamíferos. Los SSB no resueltos a menudo colapsan la replicación del ADN, bloquean la transcripción en curso y efectúan la activación de PARP-1 (poli (ADP-ribosa) polimerasa-1), que libera  $\text{NAD}^+$  celular, ATP y factor inductor de apoptosis en las células, otra proteína implicada en la reparación de SSB es XRCC1 (que también funciona en BER) (Chatterjee y Walker, 2017).

Casi inmediatamente después de que se forma un DSB, es decir, después de la exposición a la radiación ionizante, una variante particular de las histonas, H2AX, que recubre el ADN a lo largo de todo el genoma, se fosforila hacia arriba (5') y hacia abajo (3') de un DSB, unos millones el par de bases de distancia, amplificando así la señal e iniciando una respuesta celular global. Las DSB representan sustratos altamente reactivos para las proteínas de reparación final de ADN, son lesiones potencialmente mutagénicas, capaces de translocar y reordenar secuencias de genes que predisponen a las personas a una variedad de trastornos neurodegenerativos y muchas formas de cáncer (Durant, 2017).

## Figura 2

*Tipos de daños al ADN*



*Nota.* Adaptado de *DNA damage*, (p. 3), por S. Durant, 2017, *Encyclopedia of Cancer*.

## 1.2 Evaluación genotóxica: Biomarcadores

La OMS (1993, como se citó en Knudsen & Merlo, 2012) definió a los biomarcadores en relación con la evaluación de riesgos, donde el término "biomarcador" se usa en un sentido amplio para incluir casi cualquier medida que refleje una interacción entre un sistema biológico y un agente ambiental, que puede ser químico, físico o biológico. Se identifican tres clases de biomarcadores:

- Biomarcador de exposición: una sustancia exógena, su metabolito, o el producto de una interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula o célula objetivo que se mide en un compartimento dentro de un organismo;
- Biomarcador de efecto: una alteración bioquímica, fisiológica, conductual o de otro tipo medible dentro de un organismo que, dependiendo de la magnitud, puede reconocerse como asociada con una enfermedad establecida o posible;
- Biomarcador de susceptibilidad: un indicador de la capacidad inherente o adquirida de un organismo para responder al desafío de la exposición a una sustancia xenobiótica específica (p. 2).

La genotoxicidad es un punto toxicológico importante que debe tomarse en consideración durante el proceso de evaluación de seguridad, por ende la identificación de posibles mutágenos tiene una importancia crucial en el desarrollo de medicamentos, ingredientes cosméticos, aditivos alimentarios, insecticidas y otros agentes utilizados en aplicaciones industriales y de consumo (Turkez et al., 2017). Teniendo en cuenta lo anteriormente descrito, algunas agencias reguladoras como la Agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, *Food and Drug Administration*) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*) exigen pruebas de genotoxicidad como requisito para la validación de medicamentos. Estas pruebas incluyen ensayos *in vitro* para detectar el potencial de fármacos para inducir mutaciones genéticas y/o aberraciones cromosómicas (Pinheiro Araldi et al., 2015), y son particularmente importantes para compuestos que presenten un uso generalizado tratar de confirmar *in vivo* tales efectos (Repetto-Jiménez y Repetto-Kuhn, 2009).

Se han desarrollado diferentes sistemas de prueba, en los que se realizan ensayos *in vitro* que utilizan sistemas bacterianos y líneas celulares, así como pruebas en las que se exponen mamíferos *in vivo*. Dichos marcadores de daño temprano se asocian en su mayoría con procesos que miden el daño al DNA, como es la determinación directa de daño al DNA por electroforesis en gel de células individuales o "ensayo cometa", (Ostrosky Wegman y Gonzebatt, 1997).

### **1.2.1 Ensayo Cometa**

El ensayo cometa, también conocido como electroforesis en gel de células individuales, tiene la capacidad de medir el daño acumulativo al ADN causado por la mezcla de contaminantes genotóxicos a los cuales se ven expuestos los organismos (Juliana da Silva et al., 2000). Entre las pruebas de genotoxicidad disponibles, este ensayo se reconoce debido a su sensibilidad y poder estadístico para evaluar las roturas de ADN, que pueden considerarse características de mutagenicidad (Pinheiro Araldi et al., 2015). El método alcalino fue desarrollado por Singh et al. (1988), en cuyas condiciones de pH ( $\geq 13$ ) la migración del ADN es asociada con elevados niveles de rupturas de simple y doble cadena, con sitios de reparación por escisión incompletos y sitios álcali-lábiles, convirtiéndose en uno de los más aplicados en la actualidad (Rodríguez-Rey et al., 2016; Singh et al., 1988).

El principio de este ensayo es que, el ADN en condiciones normales se encuentra enrollado, mientras que al estar dañado o roto y ser sometido a un campo electromagnético, migra más que un ADN sin daño. Al observar las células luego de exponerlas a una electroforesis asemeja a un cometa, cuya cabeza representa el ADN sin daño, mientras que la cola del mismo es el ADN dañado o fragmentado (Corona Vadillo et al., 2008); la detección de la migración del ADN alterado depende de varios parámetros, tales como: la concentración de la matriz de agarosa, el pH, la temperatura y duración del desenrollamiento de la hebra de ADN, voltaje, amperaje y duración de la electroforesis (Rodríguez-Rey et al., 2016). Para esto es importante seguir algunos pasos que comprenden la obtención de suspensiones de células individuales embebidas en un gel de agarosa, una lisis celular consecutiva con detergente y alto contenido de sal donde se elimina las membranas celulares y nucleares, las

proteínas y se libera el ADN para su posterior electroforesis. Dicho procedimiento se realiza en condiciones alcalinas ( $\text{pH} \geq 13$ ) donde el ADN migra hacia el ánodo, prosiguen la visualización por microscopía de fluorescencia y el análisis de las imágenes microscópicas donde se cuantifica la migración de ADN mediante un software especializado de imágenes (Schmezer, 2014). Existen diversidad de softwares, diseñados para comparar varios parámetros utilizados para medir el alcance del daño en el ADN tales como: longitud de cola, porcentaje de ADN en la cola del cometa y el momento de cola, mismo que fue definido y desarrollado por Olive et al. (1990) como el producto del porcentaje de ADN en la cola y el desplazamiento entre el centro de masa de la cabeza y el centro de masa de la cola, el cual mostró la mayor sensibilidad para detectar daños inducidos por la radiación (Kent et al., 1995; Olive et al., 1990). Adicionalmente se desarrolló la categorización del cometa en cinco clases (0-4 o A-E), reportado en unidades arbitrarias (Rodríguez-Rey et al., 2016).

Éste método presenta diversas utilidades entre ellas, probar la genotoxicidad de nuevos compuestos antes de ser liberados al mercado, detectar la presencia de contaminantes ambientales, el biomonitoreo humano y la epidemiología molecular, así como para investigación básica del daño del ADN y sus sistemas de reparación (Corona Vadillo et al., 2008). Dicho ensayo ha sido recomendado por agencias reguladoras, como la Agencia de Protección Ambiental (EPA), para usarse ampliamente como un método rápido, sensible y económico que permite detectar cambios primarios en el ADN que aún pueden ser eliminados por el sistema de reparación; a su vez, se ha utilizado con éxito en la evaluación de interacciones entre antioxidantes y compuestos genotóxicos, considerándose una herramienta poderosa en la investigación de compuestos genotóxicos en células de roedores y humanos tanto *in vivo* como *in vitro* (Serpeloni, 2012).

Møller (2018) aduce que el ensayo del cometa es una técnica bien establecida en genotoxicología, aunque la mayoría de los estudios realizados solo evalúan los niveles de roturas de cadenas de ADN, es evidente la necesidad de explorar la estabilidad del ensayo en condiciones experimentales, debido a la incertidumbre del efecto de los factores de confusión para el nivel basal de daño en el ADN. Al ser un ensayo muy versátil, ampliamente

aplicado e ideal para detectar daños en el ADN, el mencionado autor considera que el ensayo cometa está listo para otros 30 años, en los que se espera se desarrollen mejoras técnicas y nuevas aplicaciones del mismo.

### **1.2.2 Cultivos celulares: Línea celular Chinese Hamster Ovary (CHO K-1)**

Los cultivos celulares se idearon por primera vez a principios del siglo XX como método para estudiar el comportamiento de las células animales libres de variaciones sistémicas que puedan surgir *in vivo*, este término es utilizado para referirse a un cultivo derivado de células dispersas tomadas de tejido original, de un cultivo primario o de una línea celular o cepa celular por desagregación enzimática, mecánica o química. Dicha tecnología de cultivo puede ser útil para diferentes tipos de investigación en medicina e industria que evalúan la interacción ambiental del cultivo, por ejemplo, citotoxicidad, carcinogénesis, acción farmacológica e interacciones ligando-receptor, entre otras (Freshney, 2010). Dentro de los distintos tipos de cultivo, las células inmortalizadas ofrecen gran homogeneidad de la muestra, son de fácil mantenimiento y manipulación, permitiendo tener bajo control todas las condiciones de crecimiento del cultivo (temperatura, pH, humedad, composición del medio de cultivo) y realizar diseños experimentales muy versátiles que combinen la evaluación de grandes rangos de concentración con múltiples tiempos de exposición (Peropadre López, 2014).

En los últimos 50 años se ha desarrollado una gran batería de pruebas en bacterias y en líneas celulares humanas y de mamíferos en cultivo. En ausencia de estudios epidemiológicos o experimentales en animales, estas pruebas de toxicología genética *in vitro* son útiles para los reguladores en la toma de decisiones sobre qué sustancias deben considerarse potencialmente genotóxicas para los humanos. Proporcionan una base de datos para su uso en análisis de estructura-actividad (Lansdown, 2014).

La línea celular CHO K-1 (Chinese Hamster Ovary), obtenida a partir de un explante de tejido de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*), puede manipularse genéticamente y crecer como células adherentes o en suspensión (Xu et al., 2011), ofreciendo gran versatilidad para diferentes ensayos altamente sensibles para detectar y medir diferentes

tipos de daño genético con una respuesta rápida, por lo que ha sido la de mayor difusión en este tipo de estudios (Sánchez-Lamar, 1999).

### **1.3 Medicina tradicional**

La OMS define a la medicina tradicional como el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2018b).

Aproximadamente el 80% de la población mundial aún depende del uso de plantas para los cuidados primarios de salud; este hecho es evidente sobre todo en las prácticas ancestrales de las comunidades tradicionales que viven en áreas rurales (Romero-Benavides et al., 2017; Tinitana et al., 2016). Incluso hoy en día en la medicina occidental, y a pesar del progreso en química sintética, se calcula que los productos naturales representan alrededor del 50% de los fármacos de uso clínico en países desarrollados (Bautista, 2010) y de éstos, el 25% deriva de plantas superiores. Por lo tanto, las plantas siguen siendo un aspecto importante de los estudios fitoquímicos (Romero-Benavides et al., 2017).

En el mundo existen aproximadamente 20 000 especies de plantas, de las cuales 20% son endémicas y se encuentran en Ecuador. El Ecuador continental es la tercera región con la densidad más alta de especies de plantas endémicas en todo el mundo, donde la producción de metabolitos secundarios es favorecida por la diversidad de microambientes (Bailon-Moscoso et al., 2015); pese a ello, la mayoría de las plantas nativas descritas en nuestro país no han sido investigadas hasta ahora en lo que respecta a su composición química, lo que convierte a Ecuador en una fuente invaluable de moléculas potencialmente nuevas de interés biológico y farmacéutico (García et al., 2020; Gilardoni et al., 2020).

Se estima que en Ecuador 273 especies de plantas son comercializadas en mercados tradicionales, localizados particularmente en las principales urbes del callejón interandino (Ambato, Quito, Riobamba, Nueva Loja, Puyo y Tena). Estas ciudades son los principales

puntos para el comercio de plantas medicinales, desde los cuales a través de diversas rutas se distribuyen por todo el país (Orellana et al., 2020; Tinitana et al., 2016).

Dentro de la medicina tradicional podemos incluir el uso de plantas enteras, partes de éstas (hojas, raíces, tallos, frutas, flores, semillas, ramitas y cortezas) o compuestos activos aislados con fines curativos y paliativos de muchas enfermedades (Scovassi A. y Guamán-Ortiz, 2013). Dicha tradición en nuestra cultura ya no hace parte exclusiva de las generaciones anteriores, pues muchas plantas que fueron usadas de forma empírica cuentan hoy con un sustento científico por lo que se usan y comercializan ampliamente (Pérez et al., 2004).

### **1.3.1 *Productos naturales y genotoxicidad***

El interés por un gran número de productos tradicionales de origen natural ha ido aumentando. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje de las 500 000 especies de plantas del mundo se han investigado fitoquímicamente y, de ellas, las que se han estudiado buscando efectos biológicos o farmacológicos son apenas una pequeña porción. El desarrollo de fármacos y productos para diferentes aplicaciones en algunos casos es el resultado de estudios colaborativos o interdisciplinarios que se inician en el descubrimiento y aislamiento de compuestos químicos naturales, principalmente de plantas. En este desarrollo es necesario efectuar una evaluación del riesgo potencial que implicaría la exposición a los agentes involucrados (Franco, 2003).

En nuestro país, se han realizado varios estudios sobre el uso de las plantas por las comunidades, más en su mayoría, han sido enfocados en la catalogación de especies y sus usos (Jijón, 2015), haciendo notoria la necesidad de desarrollar estudios adicionales para evaluar la capacidad genotóxica de compuestos naturales con fines terapéuticos, una herramienta útil para la identificación de riesgos a la salud humana, tomando en consideración que las mutaciones que alteran la expresión génica, la mayoría de las veces son responsables de enfermedades graves como el cáncer (Estrada, 2014).

La evaluación de la toxicidad o los efectos protectores de diversas especies utilizadas en la medicina tradicional es fundamental y cada vez recibe más atención por su posible

aplicación en enfermedades (Bailón-Moscoso et al., 2015). Este tipo de investigaciones presenta un reto de grandes proporciones, garantizar el uso seguro de productos naturales, ya que es frecuente relacionar la palabra natural con inocuo y desconocer las posibles reacciones adversas que estos productos pueden presentar (Brugés y Reguero Reza, 2007).

Basados en lo anteriormente mencionado y con el fin de contribuir al fortalecimiento de investigaciones etnobotánicas, fitoquímicas, etnofarmacológicas y uso racional de especies medicinales en nuestro país, se realizó la evaluación de genotoxicidad de cuatro especies de plantas medicinales empleadas por nuestra población, cuyos nombres y principales características se detallan en la Tabla 1.

Estudios previos de carácter etnobotánico y fitoquímico sobre especies medicinales, que pertenecen al mismo género y familia de las especies estudiadas en el presente trabajo, indican la presencia de ciertos metabolitos secundarios o compuestos bioactivos en las mismas, los cuales se especifican en la

**Tabla 2.**

**Tabla 1**

Características de las especies estudiadas.

Nombre científico	Nombre común	Familia	Distribución	Usos medicinales	Características
<i>Geranium diffusum</i> Kunth	Cáncer Geranio de páramo (Bernal et al., 2012b)	Geraniaceae. Juss ( <i>Tropicos.org</i> , 2009a)	Región de los Andes desde Venezuela a Perú (Aedo, 2010). En Ecuador: Crece en los páramos desde los 2500 - 4000 msnm., en las provincias Azuay, Bolívar, Cañar, Carchi, Chimborazo, Cotopaxi, Imbabura, Loja, Napo, Pichincha, Tungurahua y Zamora Chinchipe. ( <i>Tropicos.org</i> , 2009a)	El uso en infusión de sus raíces y fruto sirve para aliviar las infecciones (Jijón, 2015), para aliviar golpes heridas y dolor de dientes (Hensen, 1991)	Hierba con hojas ± densamente cubiertas por pelos pequeños y comprimidos en ambas superficies (Aedo, 2010).
<i>Bauhinia tarapotensis</i> <i>Benth</i>	Pata de vaca Pezuña de vaca Falsa caoba Caoba del País Caubá Árbol de las orquídeas (Chaglla Criollo, 2015)	Caesalpiniaceae R. Br. ( <i>Tropicos.org</i> , 2009b)	Bosques secundarios de la Amazonía en Sudamérica Brasil, Argentina, Paraguay, Bolivia, Uruguay, Colombia (Chaglla Criollo, 2015) y en Ecuador, específicamente en las provincias de Morona-Santiago, Napo, Pastaza y Zamora-Chinchipe ( <i>Tropicos.org</i> , 2009b)	Infusión de sus hojas usado para lavar y cicatrizar heridas, por vía interna como diurético, antiinflamatorio, digestivo y expectorante (Chaglla Criollo, 2015). Su corteza se utiliza contra la diarrea, y la raíz como antihelmíntico (Bernal et al., 2012a).	Árbol de unos 10 m de alto, con ramas colgantes, hojas alternas, divididas en dos hasta la mitad, de unos 12 cm de largo, de color café por debajo, flores de pétalos blancos y angostos, de unos 8 cm de largo, y con frutos en legumbre plana, angosta y seca de color café, que encierra varias semillas aplanadas (Bernal et al., 2012a).

	Bejuco cadenoso Escalero Patevaca Zanco de mula (Bernal et al., 2012a)			Para regular el colesterol (de la Torre et al., 2008). Aliviar infecciones, contra parásitos y hongos ( <i>Tropicos.org</i> , 2009b).	
<i>Tragia volubilis</i>	Ortiga brava Ortiga Enredadera peludilla Enredadera brava (Mulgura de Romero y Gutierrez de Sanguinetti, 1989) Ortiguilla (Bernal et al., 2012c)	Euphorbiaceae Juss. ( <i>Tropicos.org</i> , 2009c)	Regiones tropicales y subtropicales o templadas cálidas (Miller y Webster, 1967), se distribuye ampliamente en Latinoamérica, en países como Argentina, Brasil, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Panamá, Nicaragua, Paraguay y Perú ( <i>Tropicos.org</i> , 2009c)	Su raíz se utiliza como medicamento diurético, también contra enfermedades venéreas y úlceras (Mulgura de Romero y Gutierrez de Sanguinetti, 1989)	Vid trepadora (Rodríguez et al., 2011; <i>Tropicos.org</i> , 2009d), con tallos delgados, volviéndose algo leñosos; poco a densamente cubierta de pelos urticantes; pecíolo de 0.5-1.5 cm de largo; estípulas persistentes de 2-3 mm de largo; brácteas estrechamente ovadas-trianguulares de 1-1.5 mm de largo, menores y enteras; flores estaminadas con 3 estambres y sin nectario (Gutierrez de Sanguinetti y Mulgura de Romero, 1986).
<i>Picramnia magnifolia</i>	Quemacate (Bernal et al., 2012d)	Picramniaceae Fernando & Quinn ( <i>Tropicos.org</i> , 2009d)	En algunos países de Latinoamérica como Venezuela, Colombia, Perú y Ecuador (Pirani, 1990), crece desde tierras bajas a ambos lados de Los Andes	Sus hojas maceradas en agua sirven como tratamiento de afecciones cutáneas, extractos etanólicos y acuosos	Arbusto, árbol nativo (Bernal et al., 2012d) de 2 mts de altura. Tiene pequeñas flores rosadas de 0,7 cms. que se encuentran en

			<p>incluyendo el bosque andino hasta bosques húmedos de la Amazonía abarcando una altitud de hasta 2500 m.s.n.m., provincias de Carchi, Cotopaxi, Morona-Santiago, Napo, Pastaza y Zamora-Chinchipe, donde a menudo son elementos florísticos infrecuentes (Cornejo, 2011; Pirani, 1990; <i>Tropicos.org</i>, 2009d)</p>	<p>presentaron actividad antimicrobiana sobre <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella sp.</i>, <i>Bacillus cereus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> (Andoque et al., 2006)</p>	<p>racimos. Sus frutos son globosos y amarillos. Igualmente presenta lenticelas alargadas en el tallo (Andoque et al., 2006)</p>
--	--	--	--	--	--

**Tabla 2**

*Metabolitos secundarios o compuestos bioactivos presentes en el género o familia de las especies estudiadas*

Familia	Género	Composición química
Geraniaceae	<i>Geranium L.</i>	<p>Cumarinas, alcaloides, saponinas, glucósidos cardiacos, quinonas, azúcares reductores (Amabeoku, 2009; Hernández-Guerrero et al., 2018).</p> <p>Taninos condensados como ácido gálico, galato de metilo (Siddikov, Bobakulov, Turgunov, et al., 2019), e hidrolizables como geranina (Amabeoku, 2009; Graça et al., 2019; Hernández-Guerrero et al., 2018; Qahtan Mostafa Al-Smail y Adnan Hussein, 2019; Sabuncuoğlu et al., 2017).</p> <p>Otros flavonoides como quercetina (quercetin 3-furanósido (Añazco Loayza, 2020), quercetina 4-O-β –glucopiranósido), isorhamnetina, (isorhamnetin 3-glucósido (Añazco Loayza, 2020), isorhamnetina-3-O-β-D-glucopiranósido, isorhamnetina-3-O-vicianosida) isoquercitrina, hiperina, rutina (Añazco Loayza, 2020) y nicotiflorina (Siddikov et al., 2019; Siddikov et al., 2019; Wang et al., 2019), kaempferol, (Sabuncuoğlu et al., 2017; Siddikov et al., 2019).</p>

		<p>Pseudocolumbamina, palmatina, columbamina. Geraniósido A, Geraniósido B, pusilagina, 1,3,6-tri-O-galloil-<math>\beta</math>-glucopiranososa, 1,2,3,4,6-penta-O-galloil-<math>\beta</math>-glucopiranososa (Sabuncuoğlu et al., 2017).</p> <p>Tocoferol – Vitamina E (<math>\alpha</math>-tocoferol <math>\beta</math>-tocoferol, <math>\gamma</math>-tocoferol y <math>\delta</math>-tocoferol) y ácido elágico (Graça et al., 2016)</p> <p>Glucósidos de flavona (glucósido de apigenina-6-C y el glucósido de lutelina-6-C-glucósido) y una mezcla anomérica de 2,3-dygalloil-4,6-HHDP-D –glucosa (Graça et al., 2020), 5-epi-sawaranin (diastereoisómero de sawaranin), una nueva butirolactona denominada charlesolid (Siddikov et al., 2019).</p>
Caesalpiniaceae	<i>Bauhinia</i> L.	<p>Flavonoides (rutina, quercetina, kaempferol (Chaglla Criollo, 2015), apigenina, apigenina 7-O-glucosido, kaempferitrina), saponinas, taninos, trigonelina, terpenoides, trazas de fenoles y alcaloides, antocianidinas, esteroides (<math>\beta</math>-sitosterol), glucósidos esteroidales (xilopiranosido, ribofuranósido del clonasterol), bausplendina, flavonas, un diaroilmetano, flavanonas (Arora et al., 2020; Naeem y Ugur, 2019; Pereira de Menezes Filho et al., 2020; Silva Macêdo et al., 2008). Tocoferoles, glicósidos cardíacos, luteína (Arora et al., 2020), miricetina (Pianoski et al., 2020).</p>
Euphorbiaceae	<i>Tragia</i> L.	<p>Flavonoides (amentoflavona, afzelin y quercitrina (Atiencie Valarezo, 2020)), terpenoides (clerodano), taninos, antraquinonas, saponinas (Bonam et al., 2019; Kalaivanan et al., 2016; Pallie et al., 2017; Renu et al., 2020; Salehi et al., 2019; Suryavanshi y Suryavanshi, 2019), alcaloides, glicósidos, esteroides (Bonam et al., 2019; Renu et al., 2020; Swamy et al., 2010).</p>
Picramniaceae	<i>Picramnia</i> Sw.	<p>Antraquinonas, taninos, terpenoides (ácido lup-20 (29) -eno-28-oico 3<math>\alpha</math>, 7<math>\beta</math>-dibenzoato y ácido 3<math>\alpha</math>-hidroxi-lup-20 (29) -en-28-oico 7<math>\beta</math>-benzoato, lupeol, epilupeol), crisofanol, <math>\beta</math>-sitosterol (Balderrama et al., 2001; Bermudez-Puga et al., 2020; Diaz et al., 2004; Rodríguez-Gamboa et al., 2001).</p> <p>Nuevos C-glucósidos de antrona (picramniósido G y H), nuevos C-glucósidos de oxantrona (mayósido D y E), benzantrona (6,8-dihidroxi-10 -metil-7H-benz[de]antracen-7-ona), 6,8-dihidroxi-4-metil-7H-benz[de]antracen-7-ona, nataloe-emodina, 1,5-dihidroxi-7-metoxi-3-metil antraquinona, pulmatin, crisofanina, 7-hidroxi cumarina, 7-hidroxi-6-metoxicumarina (Diaz et al., 2004), 5,3'hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona (frutos) (Robledo et al., 2015).</p>

## Capítulo 2. Fin del proyecto

### 2.1 Objetivo General

Determinar la actividad genotóxica de los diferentes extractos de: *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia*, mediante el ensayo coemta en células CHO K-1.

### 2.2 Objetivos específicos

Establecer la viabilidad de la línea celular CHO K-1 expuesta a los diferentes extractos de las plantas *Geranium diffusum* y *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia*, para establecer las dosis subtóxicas a las que se estudiará la genotoxicidad.

Determinar el efecto genotóxico de los extractos de las plantas *Geranium diffusum* y *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia*, sobre la línea celular CHO K-1, en función a la migración del ADN.

### Capítulo 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Material de estudio

Los extractos de las diferentes especies de plantas (Tabla 3), fueron proporcionados por el Ph. D. Juan Carlos Romero, docente del Departamento de Química y Ciencias Exactas de la Universidad Técnica Particular de Loja; fueron obtenidos de las hojas, parte aérea de la planta, a excepción de los de *T. volubilis* que fueron obtenidos de tallos y hojas. Se trabajó con un total de 20 extractos, asignándole un código a cada uno, el cual se describe en la Tabla 3.

**Tabla 3**

Detalle de extractos utilizados

<b>Especie</b>	<b>Fracción</b>	<b>Código</b>
<b><i>Geranium diffusum</i></b>	MeOH	Gd.MeOH
	P.Hex	GdMeOH.PHex
	P.DCM	GdMeOH.PDCM
	P. AcOEt	GdMeOH.PAcOEt
	P.BuOH	GdMeOH.PBuOH
	P.H2O	GdMeOH.PH2O
<b><i>Bauhinia tarapotensis</i></b>	Hex	Bt.Hex
	AcOEt	Bt.AcOEt
	MeOH	Bt.MeOH
	MeOH total	Bt.MeOHt
<b><i>Tragia volubilis</i></b>	H2O	TvH2O
	H2O.P.DCM	TvH2O.PDCM
	H2O.P.AcOEt	TvH2O.PAcOEt
	H2O.P.BuOH	TvH2O.PBuOH
	H2O.P.H2O	TvH2O.PH2O
	H2O.PF	TvH2O.PF
<b><i>Picramnia magnifolia</i></b>	Éter de petróleo	PmEP
	DCM	PmDCM
	MeOH	PmMeOH
	MeOH total	PmMeOHt

MeOH: metanol, DCM: diclorometano, Hex: hexano, AcOEt: acetato de etilo,

BuOH: butanol, H2O: agua, EtOH: etanol, PF: Fracción final.

Cada extracto fue disuelto en DMSO (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) a una concentración de 20 mg/mL y mantenidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A partir de esta concentración stock se procedió a preparar una solución de trabajo de concentración de 2 mg/mL en medio HAM F-12 (Gibco, Grand Island, NY, USA) base para su posterior uso.

### **3.2 Modelo biológico y cultivo celular**

Se empleó la línea celular derivada de ovario de hámster chino (*Cricetulus griseus*) CHO K-1, como modelo biológico. Las células fueron cultivadas y mantenida en medio HAM F-12 (Gibco, Grand Island, NY, USA), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), 1% de antibiótico-antimicótico (100 U/mL de Penicilina G, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de estreptomycin y 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anfotericina B) (Gibco, Grand Island, NY, USA) y L-Glutamina a 2mM (Gibco, Grand Island, NY, USA); y mantenidas a  $37^{\circ}\text{C}$  con 5% de  $\text{CO}_2$  en atmosfera húmeda. Se sembró la cantidad de 8 000 células/100  $\mu\text{L}$ /pocillo en un multiplato de 96 pocillos y se incubaron por 18 horas.

### **3.3 Tratamiento**

Se aplicó el tratamiento con los 20 extractos de las diferentes especies detalladas en la Tabla 3, a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Además, se empleó como control negativo, DMSO a una concentración de 0.25%, y como control positivo, doxorubicina a una concentración de 2  $\mu\text{M}$ . Todos preparados con medio HAM F-12; durante un periodo de incubación de 24 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$ , al 5% de  $\text{CO}_2$ , en atmósfera de húmeda.

### **3.4 Cosecha celular**

Transcurrido el tiempo de tratamiento, se realizó un proceso de tripsinización de las células de los pocillos, en el cual se usó tripsina 0.25% (Gibco, Grand Island, NY, USA) y recolectadas junto con su medio de cultivo en un microtubo de 1.5 mL, en el cual fueron centrifugadas a 10 000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular con 500  $\mu\text{L}$  de medio HAM F-12 suplementado y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriormente descritas. Una vez más se eliminó el sobrenadante dejando aproximadamente 80  $\mu\text{L}$  para resuspender; de esta suspensión se separaron 20  $\mu\text{L}$  para la

evaluación de la viabilidad celular, mientras que la suspensión celular restante se empleó para realizar el ensayo cometa; todo este procedimiento se realizó a 4°C.

### **3.5 Ensayo de viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio**

La viabilidad celular fue determinada mediante la metodología descrita por Bailon-Moscoso et al. (2016). Se preparó una solución con diacetato de fluoresceína (FDA) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) en concentración de 5 mg/mL y bromuro de etidio (Promega, Madison, WI, USA) en concentración de 1 mg/5 mL. Se diluyó la suspensión celular con 20 µL de solución FDA-Bromuro de Etidio, se tomó 20 µL de la misma y se colocó entre un portaobjetos y cubreobjetos. Luego se procedió a contar 200 células, entre vivas y muertas, en el microscopio de fluorescencia (ZEISS-Axioskop 2 plus, Alemania), con filtro N° 9, usando el objetivo 40X. Las células vivas se observaron de color verde, mientras que las células muertas, de color rojo.

### **3.6 Ensayo cometa**

Se realizó el ensayo de cometa como se describe por Bailon-Moscoso et al. (2016) con pequeñas modificaciones, que se describen a continuación:

#### **3.6.1 Preparación y montaje de las placas**

La preparación de la primera capa del portaobjetos se realizó con mínimo 24 horas previo a la cosecha celular; en la cual se colocó 150 µL de agarosa de normal punto de fusión (NMP) 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La segunda capa se formó al adicionar sobre la primera capa del portaobjetos, las células resuspendidas con 75 µL de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) 1% (Promega, Madison, WI, USA), para lo cual se usó un cubreobjetos para ayudar a esparcir la mezcla a lo largo de la placa y se llevó a refrigeración por 10 minutos para la solidificación de la agarosa, luego de los cuales se retiraron los cubreobjetos. Después se añadió una tercera capa empleando 150 µL de agarosa LMP, de la misma manera se usó un cubreobjetos y se llevó a refrigeración por otros 10 minutos. Finalmente se retiraron los cubreobjetos y las placas ya montadas, se transfirieron a una solución de lisis.

#### **3.6.2 Lisis celular**

La solución de lisis que se preparó con 10% de DMSO, 1% de Tritón X-100 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 2.5 M de NaCl (Loba Chemie, Mumbai, India), 100 mM de EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 mM de Tris Base (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a un pH 10. Las placas se mantuvieron en solución lisis por 24 horas a 4°C y en oscuridad, condiciones que se mantuvieron desde este paso y en adelante.

### **3.6.3 Electroforesis y fijación de placas**

Se dejaron reposar las placas en la cámara de electroforesis con buffer de 300 mM NaOH (Fisher Scientific, USA), 1 mM de EDTA (INVITROGEN) y pH  $\geq$  13 durante 20 minutos, para el desenrollamiento del ADN. Luego se procedió a realizar la electroforesis en condiciones de 25 V y 300 mA durante 20 minutos. Después de esto se retiró las placas, se sumergieron en una solución de neutralización (0.4 M Tris) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA) (pH 7.5) y luego se fijó con metanol para la posterior lectura de los cometas.

### **3.6.4 Lectura de cometas**

Se hidrataron las placas con agua desionizada fría, se tiñeron con 60  $\mu$ L de Bromuro de etidio (1.5  $\mu$ g/mL), se utilizó el microscopio de fluorescencia ZEISS-Axioskop 2 plus, filtro N° 14, empleando el objetivo 40X y contabilizando 100 células/placa. Posteriormente se analizó el parámetro de longitud de cola de los cometas mediante el Software Comet Assay IV (Perceptive Instruments Ltd., Reino Unido).

## **3.7 Análisis estadístico**

### **3.7.1 Resultados de viabilidad por FDA – Bromuro de Etidio.**

Se empleó el software estadístico GraphPad Prism versión 8.2.1 (San Diego, CA, USA) para determinar la viabilidad celular en porcentaje, y evaluar si ésta sobrepasa el 70% para la continuidad del ensayo. Se realizó el análisis estadístico de ANOVA de una vía y post-test de Dunnett para una comparación del efecto de los extractos con el control negativo. Valores  $p < 0.05$  se considerados significativos.

### **3.7.2 Resultados del ensayo cometa.**

Se analizó el parámetro de longitud de cola, para lo cual se realizó el análisis de ANOVA de una vía y un post-test de Bonferroni para analizar la diferencia significativa de los

resultados entre el grupo control y los grupos tratados. Valores  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

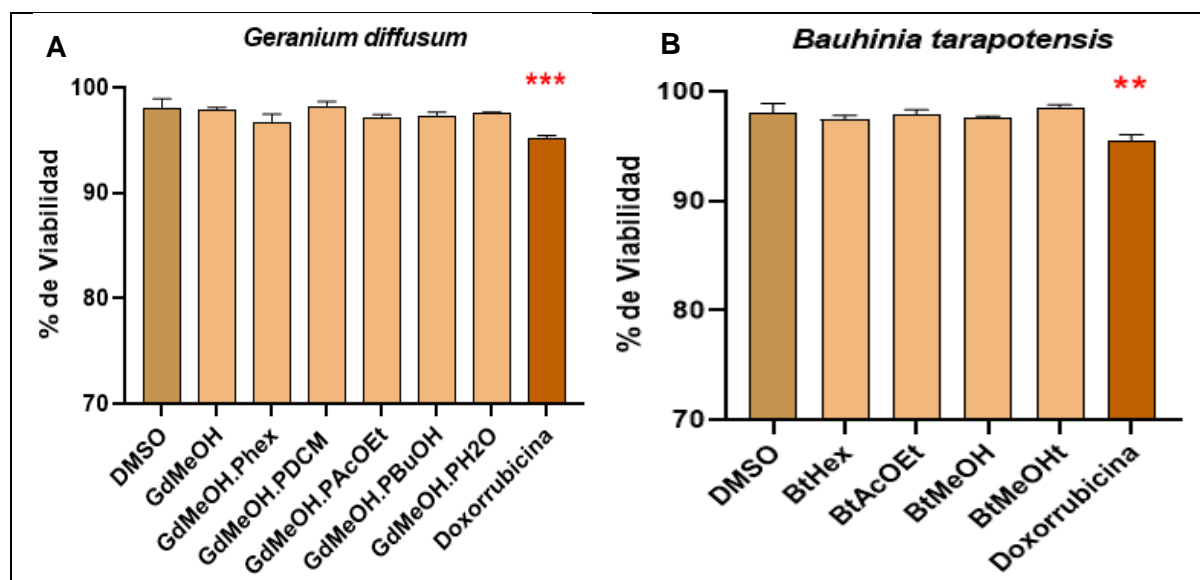
## Capítulo 4. Resultados

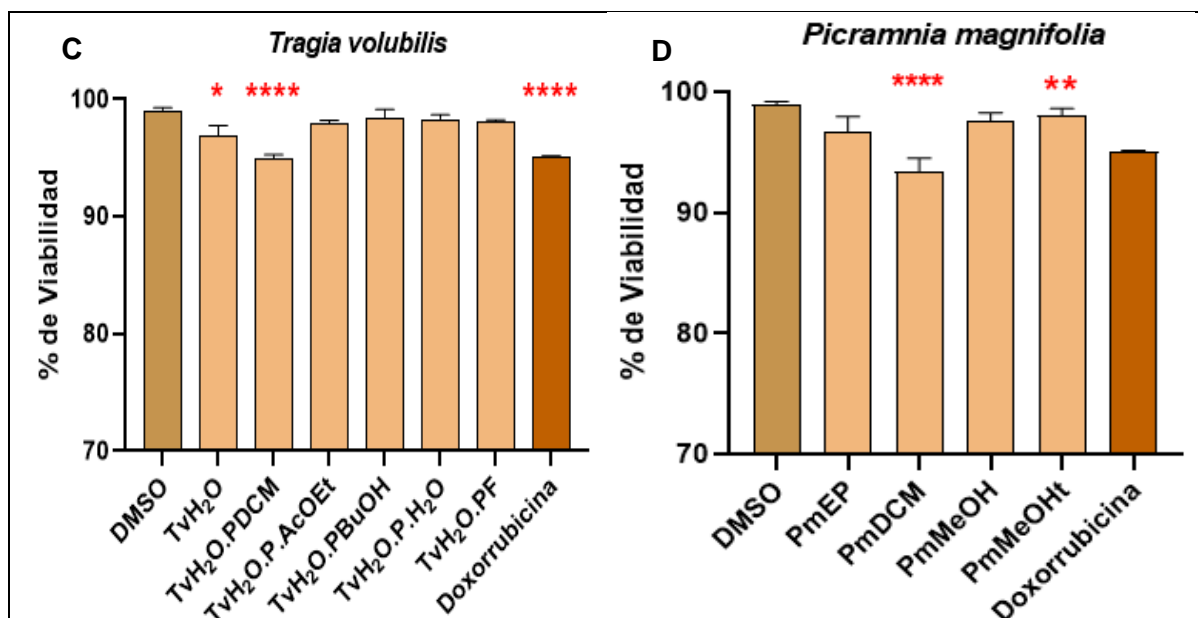
### 4.1 Viabilidad de la línea celular CHO K-1 expuesta a diferentes extractos de *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia*

Al realizar la evaluación de la viabilidad de la línea celular CHO K-1, expuestas a dosis de 100 µg/mL de los diferentes extractos de las especies *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia*; se observó que las células tratadas, incluyendo el control negativo y positivo, DMSO y doxorubicina, respectivamente, presentaron valores de viabilidad mayores al 90%. Luego de realizar el análisis post-test de Dunnet, se evidenció diferencia significativa del control positivo frente al control negativo, en todas las especies. Así mismo, los extractos que presentaron diferencias significativas en comparación con el control negativo son: TvH<sub>2</sub>O, TvH<sub>2</sub>O.DCM (Figura 3C), y PmDCM (Figura 3D), cuyos porcentajes de viabilidad fueron 96.9%, 94.9% y 93.4% respectivamente, evidenciando así escasa citotoxicidad sobre la línea celular empleada. De esta manera, se considera esencial el hecho de obtener un porcentaje de viabilidad mayor al 70% en las diferentes especies ya que permite validar los resultados de genotoxicidad del ensayo cometa (Tice et al., 2000).

**Figura 3**

Viabilidad por FDA-Bromuro de Etidio.





Nota. Células CHO K-1 expuestas a diferentes extractos de (A) *Geranium diffusum*, (B) *Bauhinia tarapotensis*, (C) *Tragia volubilis* y (D) *Picramnia magnifolia*, a dosis de 100 µg/mL durante 24 horas. Control negativo: DMSO (0.25%) y control positivo: doxorubicina (2 µM). Cada barra representa la media y error estándar de tres experimentos independientes. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post test de Dunnet, significancia frente al control negativo: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.002$ , \*\*\* $p < 0.0002$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

#### 4.2 Genotoxicidad de la línea celular CHO K-1 expuesta a diferentes extractos de *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia*

La evaluación de la genotoxicidad se realizó mediante el ensayo del cometa tomándose en consideración el parámetro longitud de cola.

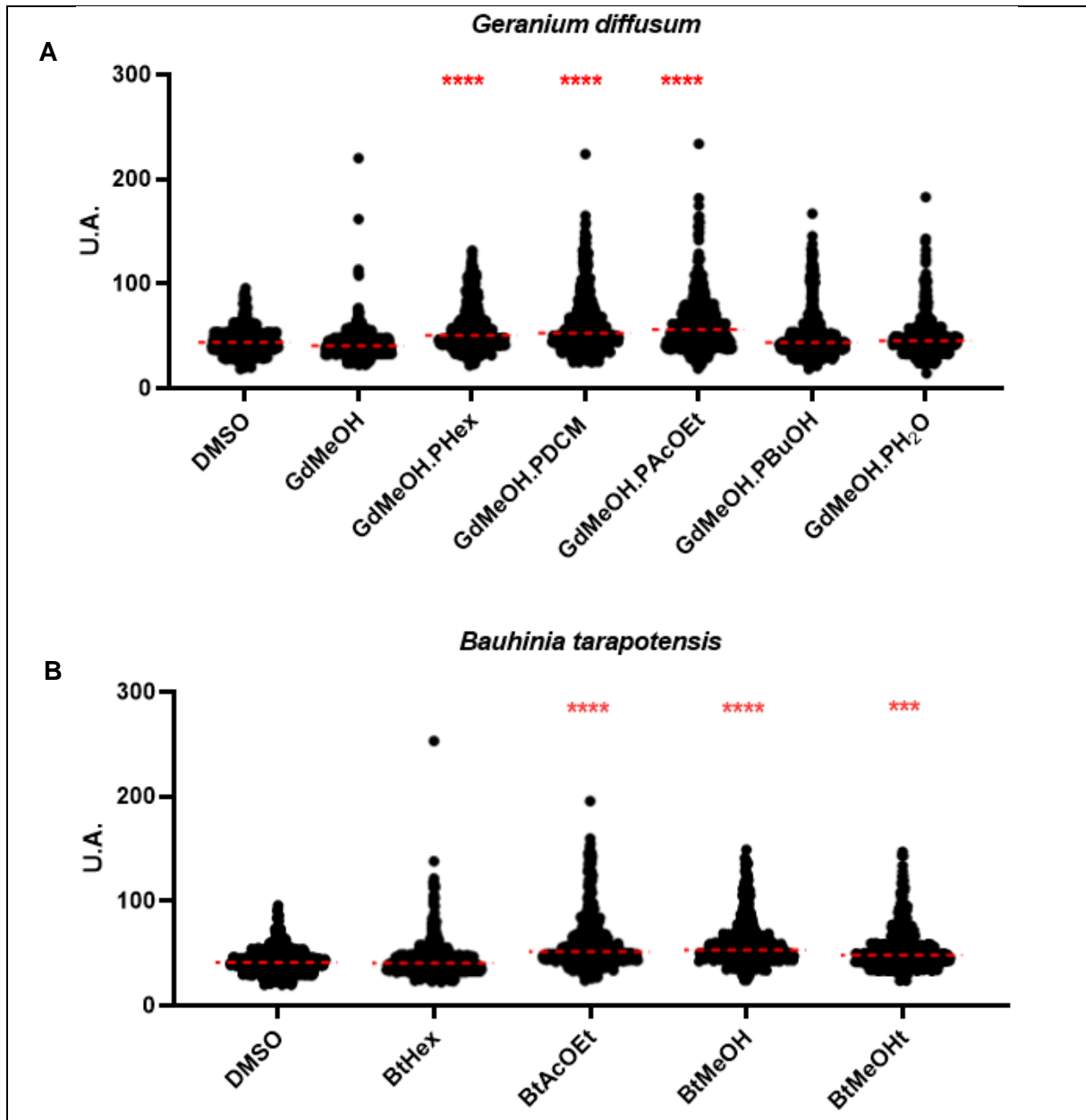
##### 4.2.1 Longitud de cola

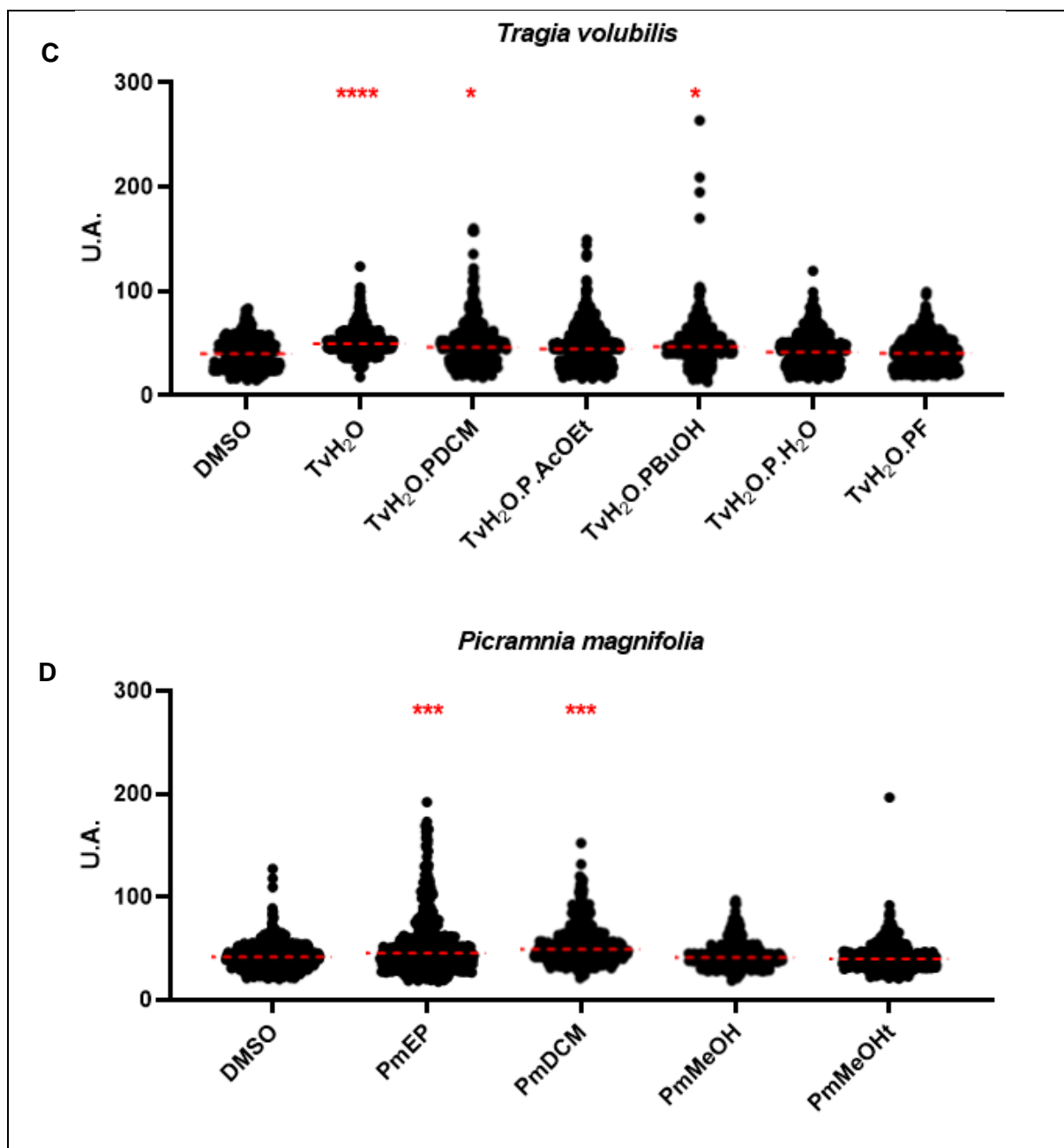
Según el análisis post-test de Bonferroni de este parámetro, se pudo observar que existe diferencia significativa entre el control positivo doxorubicina con respecto al control negativo en las diferentes especies. Así mismo, de los diferentes extractos probados, se encontró que las fracciones GdMeOH.Hex, GdMeOH.DCM y GdMeOH.AcOEt de *Geranium diffusum* (Figura 4A); BtAcOEt, BtMeOH y BtMeOht de *Bauhinia tarapotensis* (Figura 4B); el extracto TvH<sub>2</sub>O, sus fracciones TvH<sub>2</sub>O.DCM, TvH<sub>2</sub>O.BuOH de *Tragia volubilis* (Figura 4C) y PmEP, PmDCM de *Picramnia magnifolia* (Figura 4D) presentaron diferencias significativas

frente al control negativo, por lo cual representarían actividad genotóxica sobre la línea celular expuesta.

**Figura 4**

*Longitud de cola.*





Nota. Células CHO K-1 expuestas a diferentes extractos de (A) *Geranium diffusum*, (B) *Bauhinia tarapotensis* (C), *Tragia volubilis* y (D) *Picramnia magnifolia* a dosis de 100 µg/mL durante 24 horas. Control negativo: DMSO (0.25%). U. A.: Unidades arbitrarias. Cada gráfico de dispersión representa los datos de longitud de cola por cada tratamiento y mediana de tres experimentos independientes. Análisis estadístico ANOVA de una vía y post test de Bonferroni, significancia frente al control negativo: \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0002$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## Capítulo 5. Discusión

El uso de la medicina tradicional es una práctica ampliamente difundida en nuestro país, especialmente en áreas rurales, donde el comercio y uso terapéutico de plantas medicinales se mantiene para aliviar un centenar de dolencias (Orellana et al., 2020), los productos naturales, originados a partir de diversas plantas, microorganismos y formas de vida marina, constituyen una fuente importante en el descubrimiento de sustancias potencialmente bioactivas que pueden ser la base para el desarrollo de nuevos fármacos y utilizarse con éxito en numerosas aplicaciones biomédicas (Bailon-Moscoso et al., 2017; Guamán-Ortiz et al., 2020; Guaman-Ortiz et al., 2017; Silva-Rivas et al., 2020). Para ello, es indispensable evaluar la seguridad de los productos naturales empleados como medicinales, siendo la genotoxicidad de los mismos una característica importante a evaluar a fin de predecir eventuales efectos carcinógenos sobre el organismo. En este contexto, el ensayo cometa se perfila como uno de los biomarcadores de genotoxicidad cuya alta sensibilidad, bajo costo y fácil aplicación lo hacen idóneo para este tipo de investigaciones (Bailon-Moscoso et al., 2016; Fernandes Barbosa, 2014; Rodríguez-Rey et al., 2016).

En el presente trabajo de investigación se evaluó la genotoxicidad de diferentes extractos de las especies *Geranium diffusum*, *Bauhinia tarapotensis*, *Tragia volubilis* y *Picramnia magnifolia* sobre la línea celular CHO K-1, que representa un modelo biológico de células normales ideal para este ensayo (Tice et al., 2000). Las especies estudiadas junto con una variedad de otras especies que pertenecen al mismo género y familia, han tenido algunos usos medicinales y efectos terapéuticos, mismos que pueden deberse a la presencia de ciertos metabolitos o compuestos químicos en su composición química (

Tabla 2).

Previo a la realización del ensayo cometa se realizó la evaluación de la citotoxicidad de los extractos sobre la línea celular antes citada, evidenciando porcentajes de viabilidad mayores al 90% en todos los casos, de esta manera se consideró la dosis de 100 µg/mL para la continuación del ensayo Cometa. Es esencial considerar la evaluación de la citotoxicidad ya que la misma puede tener efectos en la interpretación de los datos de cometas, por

ejemplo, es posible que, a dosis citotóxicas, se pueda detectar una disminución en la migración de ADN debido a la pérdida de células muy dañadas o moribundas durante el procesamiento de la muestra y/o la electroforesis (Burlinson et al., 2007).

Los extractos de *G. diffusum* no evidenciaron ser significativamente citotóxicos a la dosis probada sobre la línea celular CHO K-1 (Figura 3A). Por su parte Correa Sinche (2020), en su trabajo de investigación encontró que, la mayoría de estos extractos a dosis de 50 µg/mL, presentaron escasa citotoxicidad sobre las líneas celulares de cáncer colorrectal RKO, SW613-B3 y HCT-116, con porcentajes de viabilidad mayores al 70%, siendo el extracto Gd.P.AcOEt el único con un porcentaje de citotoxicidad significativo (79.33%) sobre las células SW613-B3, con una  $CI_{50}$  de 44.47 µg/mL. Por el contrario, resultados reportados por Sabuncuoğlu et al. (2017), indican citotoxicidad de algunos compuestos aislados de *Geranium psilostemon* sobre la línea celular de pulmón de hámster chino (V79), cuyas  $CI_{50}$  fueron 13 (1,3,6-tri-O-galoyl-β-glucopiranososa), 15 (ácido gálico), 21 (pusilagin y metil galato) y 44 µg/mL (1,2,3,4,6-penta-O-galoyl-β-glucopiranososa).

A su vez, los resultados de citotoxicidad mostraron que los extractos de *B. tarapotensis* probados (Figura 3B), tampoco presentaron significativo efecto sobre la línea celular de ovario de hámster chino, tal como sucedió sobre las líneas celulares RKO, SW613-B3 y HCT-116, las cuales presentaron porcentajes de viabilidad mayores al 80% (50 µg/mL) (Correa Sinche, 2020). Efectos citotóxicos similares se observa con el extracto etanólico de otra especie del mismo género *Bauhinia platypetala* y su fracción etérea, mismos que presentaron un ligero efecto citotóxico dosis-dependiente sobre la línea celular V79 (Borges dos Santos et al., 2012).

Aunque el extracto acuoso y su fracción en diclorometano de *T. volubilis* (TvH<sub>2</sub>O y TvH<sub>2</sub>O.DCM) mostraron diferencias significativas frente al control negativo (Figura 3C), el porcentaje de viabilidad celular frente a éstos (< 90%), sugieren escasa citotoxicidad sobre esta línea celular a la dosis empleada. Cabe mencionar que, en un estudio alterno, una fracción similar (Tv.H<sub>2</sub>O.P.DCM), ocasionó un considerable efecto inhibitorio sobre las líneas celulares RKO y HCT-116 ( $CI_{50}$  de 38.92 y 37.80 µg/mL respectivamente) (Correa Sinche,

2020). Del mismo modo, especies del mismo género y familia han sido estudiadas, *Euphorbia tirucalli*, exhibió un efecto inhibitorio sobre células de Linfoma de Burkitt (Daudi) a dosis de 500 µg/mL; considerando que su composición química dependió la temporada de recolección de la planta y, por lo tanto, se reflejó en la viabilidad de la línea celular mencionada (Caxito et al., 2017), por otro lado *Tragia involucrata* tuvo un efecto radioprotector sobre linfocitos expuestos a radiación gamma, al inhibir la ruta apoptótica mitocondrial (Thimmaiah Nivya et al., 2019).

De la especie *P. magnifolia*, su extracto en Diclorometano (PmDCM) presentó diferencia significativa frente al control negativo (Figura 3D), esta escasa citotoxicidad concuerda con la evidenciada sobre otras líneas celulares (RKO, SW613-B3 y HCT-116) (Correa Sinche, 2020). En este sentido, los resultados contrastan con estudios del extracto en DCM de especies similares, altamente citotóxico sobre U-937 (*Picramnia gracilis*), aunque sus extractos etanólico, acetato de etilo y el compuesto aislado (5,3'-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanona) no lo fueron (Robledo et al., 2015); el compuesto nataloe-emodina aislado de *Picramnia latifolia* medió una respuesta citotóxica media ( $ED_{50} \leq 5 \mu\text{g/mL}$ ) sobre diferentes líneas celulares: cáncer de pulmón humano (Lu1), cáncer de próstata dependiente de hormonas (LNCaP), carcinoma de mama (MCF-7) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) (Diaz et al., 2004).

El hecho de que todos los extractos de las especies estudiadas presentaron escasa citotoxicidad sobre la línea celular CHO K-1, se considera un hecho trascendental para la continuación de la evaluación genotóxica de dichas especies sobre la misma. Al no existir reportes de genotoxicidad de las especies estudiadas, partiremos de información de sus compuestos aislados, así como de otras especies de su género y familia en los que se haya evaluado dicha actividad.

Se pudo evidenciar que en la especie *Geranium diffusum*, las fracciones GdMeOH.Hex, GdMeOH.DCM y GdMeOH.AcOEt, mostraron significativa actividad genotóxica en comparación con el control negativo (Figura 4A). En este sentido, Sabuncuoğlu et al., (2017) indica resultados de genotoxicidad de compuesto aislados de *Geranium*

*psilostemon* sobre la línea celular de pulmón de hámster chino (V79), 1,3,6-tri-O-galoyl- $\beta$ -glucopiranososa, ácido gálico, pusilagin y metil galato, y 1,2,3,4,6-penta-O-galoyl- $\beta$ -glucopiranososa, siendo este último el que causó mayor daño en el ADN, resultados que son consistentes con los del presente trabajo. Añazco Loayza (2020) reportó, en la fracción de acetato de etilo del extracto metanólico de *G. diffusum*, la presencia de tres compuestos flavonoides que se identificaron como, rutin, un posible nuevo compuesto quercetin 3-furanósido y una mezcla de dos flavonoides glicosilados, uno de ellos con características espectroscópicas similares a las de isorhamnetin 3-glucósido. Las especies del género *Geranium* son ampliamente utilizadas debido a sus diferentes efectos terapéuticos, reconociéndose sus propiedades antioxidante, antihelmíntica, antibacteriana, antiviral, antifúngica, anti-inflamatoria, diurética e incluso anticancerígena (citotoxicidad sobre algunas líneas celulares tumorales) (Graça et al., 2020).

Adicionalmente, el extracto BtMeOHt y las fracciones BtAcOEt, BtMeOH de *Bauhinia tarapotensis* (**Figura 4B**), evidenciaron actividad genotóxica sobre la línea celular estudiada, tal como, el extracto etanólico de *Bauhinia platypetala* y su fracción etérea sobre la línea celular V79, en la cual, indujeron un incremento significativo en el índice y frecuencia de daño al ADN, incluyendo un significativo efecto mutagénico sobre cepas de *S. cerevisiae* (fracción etérea) (Borges dos Santos et al., 2012). Asimismo, roturas en los enlaces fosfodiéster de ADN y sitios abásicos en el plásmido pBCKS, fueron ocasionados por la infusión (acuosa) de hojas de *Bauhinia monandra* y la lectina (BmoLL) presente en la misma, respectivamente, más no mostraron potencial mutagénico sobre cepas *E. coli* o *S. typhimurium* (Silva Macêdo et al., 2008; Sisenando et al., 2009), aunque en esta última, la especie *B. forficata* si exhibió un potencial mutagénico, la divergencia de efecto de las especies del mismo género podría deberse a su composición química (Rivera et al., 1994). Del extracto alcohólico de hojas de *Bauhinia tarapotensis*, se aislaron flavonoides: quercetina, quercetin- 3-O rutinoside (rutin), ácido clorogénico, ácido isoclorogénico y kaempferol (Chaglla Criollo, 2015). Dentro de las actividades que ostenta el género *Bauhinia* están: antiinflamatoria, antidiabética, antioxidante, antiulcerosa, y antibacteriana (Borges dos Santos et al., 2012; Naeem y Ugur, 2019).

En *Tragia volubilis*, su extracto TvH<sub>2</sub>O y fracciones TvH<sub>2</sub>O.DCM, TvH<sub>2</sub>O.BuOH reflejaron ser significativamente genotóxicos sobre la línea celular empleada (**Figura 4C**), en contraste, el pre-tratamiento con extracto metanólico de *T. involucrata*, provocó una disminución significativa en los parámetros del cometa (longitud, momento y % de ADN en la cola) y micronúcleos, en linfocitos expuestos a radiación gama, indicando posible protección contra el daño del ADN (Thimmaiah Nivya et al., 2019). Tres compuestos fenólicos, aislados del extracto metanólico de *T. volubilis*, fueron reportados por Atiencie Valarezo (2020), amentoflavona, afzelin y quercitrina, esta última también ha sido reportado en otra especie de la misma familia, *Euphorbia tirucalli* (Caxito et al., 2017). Las principales actividades evaluadas en ésta y otras especies similares son: antitumoral (Chanda y Nagani, 2013; Joshi et al., 2011; Rahman y Khan, 2013), antioxidante (Bonam et al., 2019; Thimmaiah Nivya et al., 2019), antimicrobiano y antiinflamatorio (Salehi et al., 2019).

Los extractos PmEP, PmDCM de *Picramnia magnifolia* (**Figura 4D**) presentaron diferencias significativas frente al control negativo, por lo cual representarían actividad genotóxica sobre la línea celular expuesta. Los compuestos crisofanol, y  $\beta$ -sitosterol, de tipo antraquinona y terpénico respectivamente, fueron aislados de esta especie por Bermudez-Puga et al. (2020). Existe escasa información sobre la genotoxicidad de la especie o de especies pertenecientes a su género o familia, por ende, nos basamos en genotoxicidad reportada de sus compuestos. Abramsson-Zetterberg et al. (2007), encontró que los productos de oxidación de fitoesteroles (epóxidos y trioles), no causaron una frecuencia significativa de eritrocitos policromáticos micronucleados en ratones expuestos. Por su parte, Paniagua-Pérez et al. (2005) determinó que, en dosis de hasta 1 000 mg/kg,  $\beta$ -sitosterol no pudo inducir eritrocitos policromáticos micronucleados e intercambios de cromátidas hermanas en ratones, adicionalmente se evaluó su potencial antigenotóxico, encontrando que dicho compuesto pudo reducir significativamente la frecuencia de los intercambios de cromátidas hermanas y la tasa de eritrocitos policromáticos micronucleados, inducidos por doxorubicina en las células de la médula ósea de ratones, en este sentido, se demostró que

el compuesto atrapa radicales libres de una manera dependiente de la concentración de hasta un 78.12%, mostrando su potencial como agente quimiopreventivo, resultados que discrepan con los encontrados en este trabajo (Paniagua-Pérez et al., 2008). Estudios sobre la genotoxicidad del crisofanol (Prateeksha et al., 2019), indican que, exhibió una fuerte mutagenicidad en dos cepas de *Salmonella*, TA2637 y TA1537, con o sin activación metabólica (Tikkanen et al., 1983); un efecto mutagénico insignificante en hepatocitos de rata y células V79, no evidenció potencial de aberración cromosómica en células de ovario de hámster chino (Mengs et al., 2001); mostró moderada toxicidad sobre células de linfoma de ratón, en las que la frecuencia de mutación relativa no se excedió más de dos veces en comparación con el control, no aumentó el número de células micronucleadas dependiente de la concentración y no se observaron cambios significativos en el material genético de las células tratadas (Mueller y Stopper, 1999). El trabajo de Yang et al. (2012) evaluó la interacción del crisofanol con el ADN y su eficiencia para ejercer un efecto tóxico, concluyendo que el crisofanol se une al ADN de manera similar al bromuro de etidio, mitoxantrona, adriamicina, pero no es potencialmente tóxico como estos.

Crisofanol (Diaz et al., 2004; Hernandez-Medel et al., 1996) y  $\beta$ - sitosterol han sido aislados de otras especies del mismo género (Balderrama et al., 2001; Hernandez-Medel et al., 1996; Jacobs, 2003; Rodríguez-Gamboa et al., 2001). Entre las actividades estudiadas dentro de especies del género *Picramnia* y sus compuestos están: anti-inflamatorias, analgésicas, antimutagénicas, antioxidantes, neuroprotectoras, inmunomoduladoras, anti-leishmanicidas, laxantes (Izhaki, 2002; Robledo et al., 2015) y anticarcinógenas (Diaz et al., 2004; Prateeksha et al., 2019; Robledo et al., 2015).

Dentro de la composición química de las especies estudiadas, sobresalen los compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, entre otros como compuestos terpénicos (Tabla 2). El potencial antioxidante de los flavonoides es bien conocido, kaempferol, quercetina, miricetina, son potentes antioxidantes naturales, mientras que los glucósidos flavonoides poseen alto potencial antirradical (Pianoski et al., 2020). Su actividad antioxidante o

mutagénica se explica en función del número y la posición de los grupos hidroxilo en el anillo A y B (Duarte Silva et al., 2000). A su vez, la actividad antibacteriana es otra de sus características, que se da a través de la formación de un complejo con la pared celular bacteriana (Neena et al., 2018). Diversos estudios demuestran la actividad anticancerosa de los flavonoides (quercetina, isoquercetina, rutina) sobre células de cáncer de mama, cáncer de hígado humano, cáncer colorrectal humano (Bailon-Moscoso et al., 2017).

Estudios de genotoxicidad mostraron que los ácidos tánico, elágico y gálico provocaron un aumento del momento de cola no dependiente de la concentración en células B14, donde indujeron roturas de la hebra de ADN (Labieniec y Gabryelak, 2003), una baja actividad mutagénica *in vivo* (ratones) para la quercetina y ninguna para la rutina, sin incremento en la frecuencia de micronúcleos ni daño al ADN (da Silva et al., 2002), por otro lado, fracciones de oligorutina mostraron alta actividad antígenotóxica frente a la toxicidad inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, comportamiento que parece estar correlacionado con la alta capacidad antioxidante de las mismas (Rhouma et al., 2013), mostrando que los componentes de flavonoides y taninos, además de agentes antioxidantes, podrían comportarse como prooxidantes (Labieniec y Gabryelak, 2003), además en ciertos casos, bajas concentraciones de polifenoles pueden proteger el ADN, mientras que altas concentraciones de los mismos compuestos causan daño al ADN (Matić et al., 2019).

Compuestos derivados del antraceno han sido estudiados por sus propiedades como laxante y antioxidante (Izhaki, 2002), en cuanto a su genotoxicidad depende de ciertos requerimientos estructurales. Estudios de genotoxicidad de diferentes hidroxiantraquinonas en *Salmonella* indicaron que, algunas fueron mutagénicas con la cepa TA1537, las hidroxiantraquinonas con un grupo hidroximetilo, lucidina (1,3-dihidroxi, 2-hidroximetil-antraquinona) y aloe-emodina fueron activas en otras cepas de *Salmonella*; las hidroxiantraquinonas con 2 grupos hidroxilo en las posiciones 1 y 3 (1,3-dihidroxiantraquinona, purpurina, y emodina) o aquellas con cadena lateral hidroximetilo (lucidina y aloe-emodina) fueron mutagénicas en células V79; aloe-emodina mostró efectos mutagénicos *in vitro* en el test de aberración cromosómica con células del ovario de hámster

chino y en el test de la Salmonella; en estudios *in vivo*, no se hallaron índices de actividad mutagénica para áloe-emodina, tanto en el test de micronúcleos con células de médula ósea de ratón NMRI como en test de aberración cromosómica con células de médula ósea de ratas Wistar (Morales Segura y Bachiller Rodríguez, 2007; Westendorf et al., 1990). Al analizar los posibles mecanismos de genotoxicidad de las antraquinonas, emodina, aloe-emodina y danthron (1,8-dihidroxi-antraquinona), se encontró que éstas inhibieron de forma semejante la unión no covalente de H33342 al ADN aislado, exhibieron fuertes cualidades inhibitoras de topoisomerasa II y aunque emodina y aloe-emodina no produjeron mutaciones intragénicas mientras que 1,8-dihidroxi-antraquinona si lo hizo. De esta manera, se pudo deducir que una inhibición indirecta de la actividad catalítica de la topoisomerasa II contribuye a los efectos genotóxicos inducidos por 1,8-dihidroxi-antraquinona, sin embargo, estos datos no excluyen otros posibles mecanismos que pueden contribuir a la genotoxicidad inducida por antraquinonas (Mueller y Stopper, 1999).

Pese a que algunos de los extractos probados en este estudio poseen características de genotoxicidad sobre la línea celular CHO K-1, muchas veces los resultados encontrados *in vitro* no suelen reflejarse en modelos *in vivo*, debido a que la fragmentación del ADN detectada con el ensayo cometa, representa ciertas lesiones pre-mutacionales que pueden o no corregirse posteriormente por los sistemas de reparación (Prieto Gonzales, 2015; Rodríguez-Rey et al., 2016). Por lo tanto, de comprobarse la variedad de efectos terapéuticos reportados en especies similares y su composición química en las especies estudiadas, se debe considerar la evaluación de su genotoxicidad en otros modelos biológicos *in vitro* e *in vivo* (preferiblemente de mamíferos), de manera que se logre confirmar o negar la misma para asegurar sus aplicaciones en la medicina. Los resultados de este ensayo pueden aportar en estudios análogos en los que se logre establecer con mayor precisión el mecanismo de genotoxicidad de estos extractos.

### Conclusiones

Los extractos y fracciones de *Geranium diffusum* y *Bauhinia tarapotensis* no mostraron citotoxicidad sobre la línea CHO K-1 a dosis de 100 µg/mL, mientras que TvH<sub>2</sub>O, TvH<sub>2</sub>O.DCM de *Tragia volubilis* y PmDCM de *Picramnia magnifolia* mostraron una disminución de la citotoxicidad no mayor al 10% sobre la línea celular CHO K-1 a la misma dosis.

Las fracciones GdMeOH.Hex, GdMeOH.DCM y GdMeOH.AcOEt de *Geranium diffusum*; el extracto BtMeOHt, sus fracciones BtAcOEt y BtMeOH de *Bauhinia tarapotensis*; el extracto TvH<sub>2</sub>O, sus fracciones TvH<sub>2</sub>O.DCM, TvH<sub>2</sub>O.BuOH de *Tragia volubilis* y los extractos PmEP, PmDCM de *Picramnia magnifolia*, presentaron genotoxicidad en el parámetro longitud de cola, a la dosis probada.

### **Recomendaciones**

Debido al uso de las especies en la medicina tradicional y su posible actividad citotóxica sobre líneas celulares tumorales, se recomienda realizar otro tipo de ensayos de genotoxicidad como test de micronúcleos, sobre modelos biológicos de células humanas normales, o test de Ames para corroborar la actividad genotóxica de los extractos. Así mismo serían necesarios estudios de genotoxicidad *in vivo*, especialmente en mamíferos, para comprobar si las lesiones al ADN generadas, repercuten en mutaciones posteriores.

Sería apropiado realizar ensayos de genotoxicidad de compuestos o moléculas aislados de estas especies, a diferentes dosis e intervalos de tiempo para de esta forma, identificar los responsables de su actividad genotóxica y si ésta es dosis-dependiente.

## Referencias

- Abramsson-Zetterberg, L., Svensson, M., y Johnsson, L. (2007). No evidence of genotoxic effect in vivo of the phytosterol oxidation products triols and epoxides. *Toxicology Letters*, 173(2), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.07.006>
- Aedo, C. (2010). *Geranium pseudodiffusum* (Geraniaceae), a New Species from Ecuador and Peru. *Systematic Botany*, 35(1), 168–171. <https://doi.org/10.1600/036364410790862560>
- Amabeoku, G. J. (2009). Antidiarrhoeal activity of *Geranium incanum* Burm. f. (Geraniaceae) leaf aqueous extract in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 190–193. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.015>
- Añazco Loayza, T. L. (2020). *Estudio fitoquímico de Geranium diffusum* [Tesis de Grado. Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/26044>
- Andoque, H., Andoque, D., Andoque, M., y Andoque, H. (2006). *Plantas medicinales de la gente de Hacha* (J. A. Echeverri (Ed.)). Universidad Nacional de Colombia - Sede Amazonía.
- Arora, S. K., Hussain, M., Yende, S. R., Moharir, K., Pande, V., y Ittadwar, A. (2020). *Bauhinia purpurea*: An Updated Pharmacological Profile. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*, 6(2), 81–85.
- Atiencie Valarezo, N. C. (2020). *Estudio fitoquímico de Tragia volubilis*.
- Bailon-Moscoso, N., Cevallos-Solorzano, G., Romero-Benavides, J., y Ramirez Orellana, M. (2017). Natural Compounds as Modulators of Cell Cycle Arrest: Application for Anticancer Chemotherapies. *Current Genomics*, 18(2), 106–131. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160808125645>
- Bailón-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Sordo, M., Villacís, J., Silva, R., Celi, L., Martínez-Vázquez, M., y Ostrosky-Wegman, P. (2015). Phytochemical study and evaluation of cytotoxic and genotoxic properties of extracts from *Clusia latipes* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(1), 44–49. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.08.014>

- Bailon-Moscoso, N., Romero-Benavides, J. C., Tinitana-Imaicela, F., y Ostrosky-Wegman, P. (2015). Medicinal plants of Ecuador: A review of plants with anticancer potential and their chemical composition. *Medicinal Chemistry Research*, 24(6), 2283–2296. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1335-7>
- Bailon-Moscoso, N., Romero Benavides, J. C., Ramirez Orellana, M. I., Ojeda, K., Granda, G., Ratoviski, E. A., y Ostrosky-Wegman, P. (2016). Cytotoxic and genotoxic effects of extracts from *Annona montana* M. fruit. *Food and Agricultural Immunology*, 27(4), 559–569. <https://doi.org/10.1080/09540105.2016.1148121>
- Balderrama, L., Braca, A., Garcia, E., Melgarejo, M., Pizza, C., y De Tommasi, N. (2001). Triterpenes and anthraquinones from *Picramnia sellowii* Planchon in Hook (Simaroubaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(3), 331–333. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(00\)00054-5](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(00)00054-5)
- Basu, A. (2018). DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 970. <https://doi.org/10.3390/ijms19040970>
- Bautista, G. (2010). *Evaluación del efecto genotóxico mediante el Ensayo Cometa en linfocitos humanos de los derivados de la Argemone B ((16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona): 3-oxima, 25-O-acetil, 2 $\alpha$ -ciano, y 2-formil*. [Tesis de Grado. Universidad Técnica Particular de Loja]. [http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1880/3/UTPL\\_Bautista\\_Tambo\\_Glenda\\_Maribel\\_1030607](http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/1880/3/UTPL_Bautista_Tambo_Glenda_Maribel_1030607)
- Bermudez-Puga, S. A., Romero-Zambrano, G. L., Peñuela-Mora, M. C., Cevallos-Vallejo, A. S., Romero-Benavides, J. C., Guamán O., L. M., y Cisneros-Pérez, P. A. (2020). Caracterización Fitoquímica y Elucidación Estructural de Metabolitos Secundarios de *Picramnia* sp. en la Amazonía Ecuatoriana. *infoANALÍTICA*, 8(2). <https://doi.org/10.26807/ia.v8i2.129>
- Bernal, R., Galeano, G., Rodríguez, A., Sarmiento, H., y Gutiérrez, M. (2012a). *Casco de vaca. (Bauhinia tarapotensis)*. Nombres comunes de las plantas de Colombia. <http://www.biovirtual.unal.edu.co/nombrescomunes/en/detalle/ncientifico/12495/>

- Bernal, R., Galeano, G., Rodríguez, A., Sarmiento, H., y Gutiérrez, M. (2012b). *Geranio de páramo*. (*Geranium columbianum*). Nombres comunes de las plantas de Colombia. <http://www.biovirtual.unal.edu.co/nombrescomunes/en/detalle/ncientifico/17401/>
- Bernal, R., Galeano, G., Rodríguez, A., Sarmiento, H., y Gutiérrez, M. (2012c). *Ortiga*. (*Tragia volubilis*). Nombres Comunes de las Plantas de Colombia. [www.biovirtual.unal.edu.co/nombrescomunes/en/detalle/ncientifico/12388/](http://www.biovirtual.unal.edu.co/nombrescomunes/en/detalle/ncientifico/12388/)
- Bernal, R., Galeano, G., Rodríguez, A., Sarmiento, H., y Gutiérrez, M. (2012d). *Quemacate*. Nombres comunes de las plantas de Colombia. <http://www.biovirtual.unal.edu.co/nombrescomunes/en/detalle/ncientifico/26481/>
- Bonam, S. R., Manoharan, S. K., Pandey, V., Raya, A. R., Nadendla, R. R., Jagadeesan, M., y Babu, A. N. (2019). Phytochemical, in vitro Antioxidant and in vivo Safety Evaluation of Leaf Extracts of *Tragia plukenetii*. *Pharmacognosy Journal*, 11(2), 338–345. <https://doi.org/10.5530/pj.2019.11.50>
- Borges dos Santos, F. J., Moura, D. J., Flores Péres, V., De Moura Sperotto, A. R., Bastos Caramão, E., de Carvalho Melo Cavalcante, A. A., y Saffi, J. (2012). Genotoxic and mutagenic properties of *Bauhinia platyptala* extract, a traditional Brazilian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*, 144(3), 474–482. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.08.047>
- Brugés, K., y Reguero Reza, M. T. (2007). Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1X(1), 5–13. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77690102>
- Burlinson, B., Tice, R. R., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, S. Y., Collins, A. R., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, T. S., Nakajima, M., Sasaki, Y. F., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., y Hartmann, A. (2007). Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 627(1), 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.08.011>
- Bustamante, A. (2018). *Evaluación del daño genotóxico mediante determinación de*

- micronúcleos en aves de bosque seco* [Tesis de Maestría. Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/22836>
- Cabrera, H. (2010). *Evaluación de la Actividad Gentóxica de las Moléculas: Acetato de DE B-Amirina y Dehidroleucodina mediante el Ensayo CBMN en linfocitos humanos* [Tesis de Grado. Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/1853>
- Caxito, M. L. D. C., Gattass, C. R., Kuster, R. M., y Victório, C. P. (2017). Seasonal effect on *Euphorbia tirucalli* L. cytotoxicity. *Acta Scientiae et Technicae*, 5(2). <https://doi.org/10.17648/uezo-ast-v5i2.162>
- Chaglla Criollo, J. (2015). *Evaluación del efecto cicatrizante del extracto de las hojas Bauhinia tarapotensis Benth (pata de vaca) mediante lesiones inducidas en ratones (Mus musculus)* [Tesis de Grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/4616>
- Chanda, S., y Nagani, K. (2013). *In vitro and in vivo Methods for Anticancer Activity Evaluation and Some Indian Medicinal Plants Possessing Anticancer Properties : An Overview*. 2(2), 140–152.
- Chatterjee, N., y Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263. <https://doi.org/10.1002/em.22087>
- Cornejo, X. (2011). Picramniaceae. En S. León-Yáñez, R. Valencia, N. Pitman, C. Ulloa Ulloa, & H. Navarrete (Eds.), *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (2 ed., p. 710). Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Corona Vadillo, D., Cram Heydrich, S., y Rojas del Castillo, E. (2008). Ensayo de genotoxicidad con la lombriz de tierra *Eisenia andrei*. En P. Ramirez-Romero & A. Mendoza-Cantú (Eds.), *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México* (pp. 235–236). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. <https://ambientalguasave.files.wordpress.com/2010/10/ensayos-toxicologicos-para->

evaluacion-de-sustancias-quimicas-en-agua-y-suelo.pdf

- Correa Sinche, A. del C. (2020). *Citotoxicidad de extractos de Picramnia magnifolia, Tragia volubilis, Geranium diffusum, Bauhinia tarapotensis y Simira ecuadorensis, en líneas celulares tumorales humanas*. [Tesis de Grado. Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/20.500.11962/25732>
- da Silva, J, Herrmann, S. M., Heuser, V., Peres, W., Possa Marroni, N., González-Gallego, J., y Erdtmann, B. (2002). *Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by.pdf*. 40, 941–947.
- da Silva, Juliana, de Freitas, T. R. O., Marinho, J. R., Speit, G., y Erdtmann, B. (2000). An alkaline single-cell gel electrophoresis ( comet ) assay for environmental biomonitoring with native rodents. *Genetics and Molecular Biology*, 23(1), 241–245. [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572000000100042](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572000000100042)
- De la Peña de Torres, E., y Cols. (2012). *Mutagénesis y carcinogénesis química*. En M. Repetto (Ed.) Postgrado en Toxicología. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. <http://hdl.handle.net/10261/102525>
- de la Torre, L., Alarcón S., D., Kvist, L. P., y Salazar Lecaro, J. (2008). Usos medicinales de las plantas. En L. de la Torre, H. Navarrete, M. Muriel, M. J. Macía, & H. Balslev (Eds.), *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador* (pp. 105–114). Herbario QCA & Herbario AAU.
- Diaz, F., Chai, H.-B., Mi, Q., Su, B.-N., Vigo, J. S., Graham, J. G., Cabieses, F., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M., Swanson, S. M., y Kinghorn, A. D. (2004). Anthrone and Oxanthrone C -Glycosides from *Picramnia latifolia* Collected in Peru. *Journal of Natural Products*, 67(3), 352–356. <https://doi.org/10.1021/np030479j>
- Duarte Silva, I., Gaspar, J., Gomes Da Costa, G., Rodrigues, A. S., Laires, A., y Rueff, J. (2000). Chemical features of flavonols affecting their genotoxicity. Potential implications in their use as therapeutical agents. *Chemico-Biological Interactions*, 124(1), 29–51. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(99\)00139-8](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(99)00139-8)
- Durant, S. T. (2017). DNA Damage. En M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer* (pp. 1–7).

- Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27841-9\\_1669-8](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27841-9_1669-8)
- Estrada, G. (2014). *Evaluación del efecto genotóxico de los derivados de la Argentatina B ((16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona): 2 $\alpha$ -Bromo-(16 $\beta$ , 24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-3-ona, (16 $\beta$ ,24R)-16,24-epoxi-25-hidroxicicloartan-1en-3-ona, (16S,17R,20S)-3-o* [Tesis de Grado. Universidad Técnica Particular de Loja]. <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/9669>
- Fernandes Barbosa, B. F. (2014). *Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do fruto da palmeira juçara (Euterpe edulis Martius) em ratos Wistar*. [Tesis de Maestría. Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.60.2014.tde-03112014-152357>
- Franco, N. (2003). *Citotoxicidad y genotoxicidad de dos extractos naturales* [Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires]. [https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3650\\_GarciaFranco.pdf](https://digital.bl.fcen.uba.ar/download/tesis/tesis_n3650_GarciaFranco.pdf)
- Freshney, R. I. (2010). Culture of Animal Cells. En *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (Sixth ed.). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470649367>
- García, J., Gilardoni, G., Cumbicus, N., y Morocho, V. (2020). Chemical Analysis of the Essential Oil from *Siparuna echinata* (Kunth) A. DC. (Siparunaceae) of Ecuador and Isolation of the Rare Terpenoid Sipaucin A. *Plants*, 9(2), 187. <https://doi.org/10.3390/plants9020187>
- Gilardoni, G., Matute, Y., y Ramírez, J. (2020). Chemical and Enantioselective Analysis of the Leaf Essential Oil from *Piper coruscans* Kunth (Piperaceae), a Costal and Amazonian Native Species of Ecuador. *Plants*, 9(6), 791. <https://doi.org/10.3390/plants9060791>
- González, E. A. (2009). Biomarcadores de daño genético. Una mirada Practica. *Foro de Contaminación Ambiental y Salud Urbana. Centro de Altos Estudios en Ciencias de la Salud*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2901.4164>
- Graça, V. C., Barros, L., Calhelha, R. C., Dias, M. I., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Santos, P. F., y Ferreira, I. C. F. R. (2016). Chemical characterization and bioactive

- properties of aqueous and organic extracts of *Geranium robertianum* L. *Food & Function*, 7(9), 3807–3814. <https://doi.org/10.1039/C6FO01075J>
- Graça, V.C., Calhelha, R. C., Nunes, F. M., Berthet, J., Ferreira, I. C. F. R., y Santos, P. F. (2019). Isolation of secondary metabolites from *Geranium molle* L. with anticancer potential. *Industrial Crops and Products*, 142. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111859>
- Graça, Vânia C., Ferreira, I. C. F. R., y Santos, P. F. (2020). Bioactivity of the *Geranium* Genus: A Comprehensive Review. *Current Pharmaceutical Design*, 26(16), 1838–1865. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200114110323>
- Guachalla, L., y Ascarrunz, M. (2003). La Genética Toxicológica: Una ciencia en constante desarrollo / The genética Toxicológica: A science in constant development. *Biofarbo*, 11, 75–82. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-385176>
- Guamán-Ortiz, L. M., Romero-Benavides, J. C., Suarez, A. I., Torres-Aguilar, S., Castillo-Veintimilla, P., Samaniego-Romero, J., Ortiz-Díaz, K., y Bailón-MoscOSO, N. (2020). Cytotoxic Property of *Grias neuberthii* Extract on Human Colon Cancer Cells: A Crucial Role of Autophagy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020(April), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/1565306>
- Guaman-Ortiz, L., Orellana, M., y Ratovitski, E. (2017). Natural Compounds As Modulators of Non-apoptotic Cell Death in Cancer Cells. *Current Genomics*, 18(2), 132–155. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160803150639>
- Gutierrez de Sanguinetti, M. M., y Mulgura de Romero, M. E. (1986). Una Nueva Especie de *Tragia* (Euphorbiaceae). *Darwiniana*, 27(1), 491–497. <http://www.jstor.org/stable/23217346>
- Hensen, I. (1991). *La flora de la comunidad Chorojo: su uso, taxonomía y vernacular* (Agroecología Universidad Cochabamba (Ed.)). AGRUCO. <http://atlas.umss.edu.bo:8080/jspui/handle/123456789/232>
- Hernández-Guerrero, V. G., Meléndez-Camargo, M. E., Márquez-Flores, Y. K., y Arreguín-Sánchez, M. de la L. (2018). Ethnobotanical study and anti-inflammatory activity

- evaluation of *Geranium Seemannii* Peyr. (Municipality of Ozumba, State of Mexico). *Polibotánica*, 46, 287–303. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.46.19>
- Hernandez-Medel, M. D. R., Lopez-Marquez, O., Santillan, R., y Trigos, A. (1996). Mayoside, an oxanthrone from *Picramnia hirsuta*. *Phytochemistry*, 43(1), 279–281. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00160-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00160-4)
- Izhaki, I. (2002). Emodin - A secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155(2), 205–217. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00459.x>
- Jacobs, H. (2003). Comparative phytochemistry of *Picramnia* and *Alvaradoa*, genera of the newly established family Picramniaceae. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(7), 773–783. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(02\)00268-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0305-1978(02)00268-5)
- Jijón, A. (2015). *Conocimiento tradicional etnobotánico del área de influencia del Bosque Protector Aguarongo, Azuay, Ecuador* [Tesis de Grado. Universidad del Azuay]. <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/4293/1/10851.pdf>
- Joshi, C. G., Gopal, M., y Kumari, N. S. (2011). Antitumor activity of hexane and ethyl acetate extracts of *Tragia involucrata*. En *International Journal of Cancer Research* (Vol. 7, Número 4, pp. 267–277). <https://doi.org/10.3923/ijcr.2011.267.277>
- Kalaivanan, M., Jesudoss, L. L., Ganthi, S., y Subramanian, M. P. S. (2016). Pharmacognostical Studies on *Tragia plukenetti* R . Smith. *International Journal of Pharmacognosy*, 3(1), 50–54. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.3\(1\).50-54](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.IJP.3(1).50-54)
- Kent, C. R. H., Eady, J. J., Ross, G. M., y Steel, G. G. (1995). The Comet Moment as a Measure of DNA Damage in the Comet Assay. *International Journal of Radiation Biology*, 67(6), 655–660. <https://doi.org/10.1080/09553009514550771>
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., y Decordier, I. (2003). Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters*, 140–141, 63–74. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00498-8](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00498-8)
- Knudsen, L. E., y Merlo, D. F. (2012). Biomarkers and Human Biomonitoring: Ongoing Programs and Exposures. En *Issues in Toxicology* (Vol. 1). Royal Society of Chemistry.

- Labieniec, M., y Gabryelak, T. (2003). Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 539(1–2), 127–135. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00161-X](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00161-X)
- Lansdown, A. B. (2014). The Carcinogenicity of Metals Human Risk through Occupational and Environmental Exposure. En *Issues in Toxicology*. The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781849737197-FP001>
- Martinez Montaña, R. A. (2003). *Biomarcadores de genotoxicidad en el estudio de la fragilidad genómica en el orden primates* [Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires]. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3620\\_MartinezMontano.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3620_MartinezMontano.pdf)
- Matić, S., Stanić, S., y Kanjevac, M. (2019). Genotoxic effect of gallic and ellagic acids in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Kragujevac Journal of Science*, 41(41), 69–76. <https://doi.org/10.5937/kjjsoci1941069m>
- Mengs, U., Schuler, D., y Marshall, R. R. (2001). No induction of chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary cells by chrysophanol. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(01\)00150-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(01)00150-4)
- Miller, K. I., y Webster, G. L. (1967). A preliminary revision of *Tragia* (Euphorbiaceae) in the United States. *Rhodora*, 69(779), 241–305. <http://www.jstor.org/stable/23311647>
- Mitchell, A. D. (2004). Genetic toxicology. En C. Winder & N. Stacey (Eds.), *Occupational Toxicology* (2nd ed., pp. 227–263). CRC PRESS.
- Møller, P. (2018). The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*, 33(1), 1–7. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex046>
- Morales Segura, M., y Bachiller Rodríguez, L. I. (2007). Revisión de la literatura sobre la toxicidad del sen. *Rev. fitoter*, September, 31–41.
- Mudry, M. D., y Carballo, M. A. (2006). Principios de Genética toxicológica. En De los Cuatro Vientos (Ed.), *Genética toxicológica* (pp. 35–57).
- Mueller, S. O., y Stopper, H. (1999). Characterization of the genotoxicity of anthraquinones in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1428(2–3), 406–414. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00064-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00064-1)

- Mulgura de Romero, M. E., y Gutierrez de Sanguinetti, M. M. (1989). Actualización taxonómica de *Tragia* (Euphorbiaceae) para Argentina y regiones limítrofes. *Darwiniana*, 29(1), 77–138. <http://www.jstor.org/stable/23218913>
- Naeem, M. Y., y Ugur, S. (2019). Nutritional and Health Consequences of *Bauhinia variegata*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(sp3), 27–30. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7isp3.27-30.3144>
- Neena, A., Mahesh, M. P., y Thomas, B. (2018). Evaluation and comparison of antibacterial properties of three species of *Bauhinia* (Caesalpiniaceae). *Journal of Pharmaceutical Advanced Research*, 1(9), 386–390.
- Olive, P. L., Banáth, J. P., Durand, R. E., y Banath, J. P. (1990). Heterogeneity in Radiation-Induced DNA Damage and Repair in Tumor and Normal Cells Measured Using the “Comet” Assay. *Radiation Research*, 122(1), 86. <https://doi.org/10.2307/3577587>
- Orellana, A., Achig, D., Angulo, A., Barrera, G., Brito, L., y Mosquera, L. (2020). *Sabiduría Ancestral Andina y Uso de Plantas Medicinales. Principios y Prácticas de la Medicina Tradicional en Ecuador*.
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2018a). *Centro de Prensa*. Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Organización Mundial de la Salud [OMS]. (2018b). *Temas de Salud*. Medicina tradicional. [https://www.who.int/topics/traditional\\_medicine/definitions/es/](https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/)
- Ostrosky Wegman, P., y Gonzebatt, M. E. (1997). Biomarcadores moleculares en la determinación de efectos de xenobióticos. *Gac. méd. Méx*, 133(1), 93–96.
- Pallie, M., Perera, P., Goonasekara, C., Kumarasinghe, K., y Arawwawala, L. (2017). *Tragia* spp: Assessment of Diuretic Activity and Standardization of the Whole Plant. *American Journal of Ethnomedicine*, 04(01). <https://doi.org/10.21767/2348-9502.100005>
- Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes-Cadena, S., Álvarez-González, I., Sánchez-Chapul, L., Pérez-Gallaga, J., Hernández, N., Flores-Mondragón, G., y Velasco, O. (2008). Cell protection induced by beta-sitosterol: Inhibition of genotoxic damage, stimulation of lymphocyte production, and determination of its antioxidant

capacity. *Archives of Toxicology*, 82(9), 615–622. <https://doi.org/10.1007/s00204-007-0277-3>

Paniagua-Pérez, R., Madrigal-Bujaidar, E., Reyes-Cadena, S., Molina-Jasso, D., Pérez Gallaga, J., Silva-Miranda, A., Velazco, O., Hernández, N., y Chamorro, G. (2005). Genotoxic and cytotoxic studies of beta-sitosterol and pteropodine in mouse. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2005(3), 242–247. <https://doi.org/10.1155/JBB.2005.242>

Pereira de Menezes Filho, A. C., Gonçalves Romão, L. T., Borges dos Reis, E., da Silva Malaquias, K., de Souza Castro, C. F., de Oliveira Marcionilio, S. M. L., y Silva Oliveira, M. (2020). Chromatographic analysis and physicochemical evaluation of the essential oil of *Bauhinia monandra* Kurz flowers. *Research, Society and Development*, 9(8). <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.5979>

Pérez, J. E., Isaza, G., Bueno, J. G., Arango, M. C., Hincapié, B. L., Nieto, A. M., y Londoño, D. P. (2004). Efecto de los extractos de *Phenax rugosus*, *Tabebuia chrysantha*, *Althernantera illiamsii* y *Solanum dolichosepalum* sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas. *Revista Médica de Risaralda*, 10(2), 13–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.22517/25395203.7953>

Peropadre López, A. (2014). *Estudio in vitro de las respuestas celulares asociadas con la exposición a contaminantes emergentes*. 14–16. <http://hdl.handle.net/10486/660496>

Pianoski, K. E., Turco, J. F., Soares, K. C. N., Mokochinski, J. B., Caetano, I. K., da Silva, F. R., y Torres, Y. R. (2020). Identification and Characterization of *Bauhinia* Species by Spectroscopic and Spectrometric Fingerprints. *Revista Virtual de Química*, 12(5). <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200093>

Pinheiro Araldi, R., Correa de Melo, T., Biude Mendes, T., de Sá Júnior, P. L., Nakano Nozima, H. B., Tiemi Ito, E., Franco, R., Frando de Carvalho, R., Barreiros de Souza, E., y de Cassia Stocco, R. (2015). Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 72, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004>

- Pirani, J. R. (1990). Diversidade taxonômica e padrões de distribuição geográfica em *Picramnia* (Simaroubaceae) no Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 4(1), 19–44.  
<https://doi.org/10.1590/s0102-33061990000100003>
- Prateeksha, Yusuf, M. A., Singh, B. N., Sudheer, S., Kharwar, R. N., Siddiqui, S., Abdel-Azeem, A. M., Fraceto, L. F., Dashora, K., y Gupta, V. K. (2019). Chrysophanol: A natural anthraquinone with multifaceted biotherapeutic potential. *Biomolecules*, 9(2), 1–24.  
<https://doi.org/10.3390/biom9020068>
- Prieto Gonzales, E. A. (2015). BIOMARCADORES DE DANO GENETICO. Una mirada Practica. *ResearchGate*, March, 1–35. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2901.4164>
- Qahtan Mostafa Al-Smail, M., y Adnan Hussein, F. (2019). Isolation and identification of alkaloids and glycosides active compound from *Geranium lucidum* and *Geranium purpureum*. *Journal of Physics: Conference Series*, 1294(6).  
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1294/6/062040>
- Rahman, M. M., y Khan, M. A. (2013). Anti-cancer potential of South Asian plants. *Natural Products and Bioprospecting*, 3(3), 74–88. <https://doi.org/10.1007/s13659-013-0027-6>
- Renu, S., Satya, N., y Nahid, F. (2020). *Tragia plukenetii* Radcl.-Sm. (Euphorbiaceae): An Addition to Flora of Allahabad, Uttar Pradesh. *Current Botany*, 11, 36–37.  
<https://doi.org/10.25081/cb.2020.v11.5723>
- Repetto-Jiménez, M., y Repetto-Kuhn, G. (2009). *Toxicología Fundamental* (4ta ed.). Ediciones Díaz de Santos.
- Rhouma, G. B., Chebil, L., Mustapha, N., Krifa, M., Ghedira, K., Ghoul, M., y Chékir-Ghédira, L. (2013). Cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potencies of oligorutins. *Human and Experimental Toxicology*, 32(8), 881–889. <https://doi.org/10.1177/0960327113476910>
- Rivera, I. G., Martins, M. T., Sanchez, P. S., Sato, M. I. Z., Coelho, M. C. L., Akisue, M., y Akisue, G. (1994). Genotoxicity assessment through the Ames test of medicinal plants commonly used in Brazil. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 9(2), 87–93.  
<https://doi.org/10.1002/tox.2530090203>
- Robledo, S. M. M., Cardona, W., Ligardo, K., Henao, J., Arbeláez, N., Montoya, A., Alzate, F.,

- Pérez, J. M. M., Arango, V., Vélez, I. D. D., y Sáez, J. (2015). Antileishmanial Effect of 5,3'-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanone of *Picramnia gracilis* Tul. (Picramniaceae) Fruit: In Vitro and In Vivo Studies. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2015(1), 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/978379>
- Rodríguez-Gamboa, T., Fernandes, J. B., Rodrigues Filho, E., da Silva, M. F. das G. F., Vieira, P. C., Barrios Ch., M., Castro-Castillo, O., Victor, S. R., Pagnocca, F. C., Bueno, O. C., y Hebling, M. J. A. (2001). Triterpene benzoates from the bark of *Picramnia teapensis* (Simaroubaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(3), 386–390. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532001000300010>
- Rodríguez-Rey, A., Noris-García, E., y Fundora Torres, M. T. (2016). Principios y relevancia del ensayo cometa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 35(2), 184–194.
- Rodríguez, W. D., Giraldo, L. F., y Vasco, A. (2011). Listado de plantas vasculares del Departamento de Antioquia. En Á. Idárraga-Piedrahíta, R. del C. Ortiz, R. Callejas Posada, & M. Merello (Eds.), *Flora de Antioquia: catálogo de las plantas vasculares. Listado de las plantas vasculares del departamento de Antioquia*. (vol. II, pp. 472, 514, 751). Editorial D'Vinni. [https://www.tropicos.org/projectimages/Antioquia/Flora Antioquia Vol II.pdf](https://www.tropicos.org/projectimages/Antioquia/Flora%20Antioquia%20Vol%20II.pdf)
- Romero-Benavides, J. C., Ruano, A. L., Silva-Rivas, R., Castillo-Veintimilla, P., Vivanco-Jaramillo, S., y Bailon-Moscoso, N. (2017). Medicinal plants used as anthelmintics: Ethnomedical, pharmacological, and phytochemical studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 129, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.02.005>
- Sabuncuoğlu, S., Nejad, S. M., y Şöhretoğlu, D. (2017). Assesment of Cytotoxic and Genotoxic Properties of Phenolic Compounds and Hydrolysable Tannins from Geranium *Geranium psilostemon* Ledeb. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, 37(2), 63–72. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/840293>
- Salehi, B., Iriti, M., Vitalini, S., Antolak, H., Pawlikowska, E., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Oyeleye, S. I., Ademiluyi, A. O., Czopek, K., Staniak, M., Custódio, L., Coy-Barrera, E., Segura-Carretero, A., Cádiz-Gurrea, M. de la L., Capasso, R., Cho, W. C., y Seca, A. M.

- L. (2019). Euphorbia-derived natural products with potential for use in health maintenance. *Biomolecules*, 9, 1–20. <https://doi.org/10.3390/biom9080337>
- Sánchez-Lamar, Á. (1999). Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Revista Cubana de Investigaciones Biomedicas*, 18(1), 19–21.
- Schmezer, P. (2014). Comet Assay Peter. En M. Schwab (Ed.), *Encyclopedia of Cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-27841-9\\_1275-2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-27841-9_1275-2)
- Scovassi A., I., y Guamán-Ortiz, L. M. (2013). Traditional Medicine: An Ancient Remedy Rediscovered. *Biochemistry & Pharmacology*, 2(110), 2–4. <https://doi.org/10.4172/2167-0501.1000110>
- Serpeloni, J. M. (2012). *Atividade antigenotóxica de compostos da dieta e sua influência na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo* [Tese de Doutorado. Universidade De São Paulo]. <https://doi.org/10.11606 / T.60.2012.tde-04072012-111234>
- Siddikov, D. R., Bobakulov, K. M., Nishanbaev, S. Z., Sasmakov, S. A., Abdullaev, N. D., y Azimova, S. S. (2019). Phenolic Compounds from the Aerial Part of Geranium transversale and Their Antimicrobial Activity. *Chemistry of Natural Compounds*, 55(2), 348–350. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02687-7>
- Siddikov, D. R., Bobakulov, K. M., Turgunov, K. K., Nishanbaev, S. Z., Tashkodzhaev, B., Shamyaynov, I. D., y Abdullaev, N. D. (2019). New phenolic compounds from Geranium charlesii. *XII Internacionas Symposium on the Chemistry of Natural Compounds, October*, 2–5. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22788.27523>
- Silva-Rivas, R., Bailon-Moscoso, N., Cartuche, L., y Romero-Benavides, J. C. (2020). The Antioxidant and Hypoglycemic Properties and Phytochemical Profile of Clusia latipes Extracts. *Pharmacognosy Journal*, 12(1), 144–149. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.21>
- Silva Macêdo, M. F., Sisenando, H. A. A. A. C. N., Queiroz, J. D. F., Argolo, A. C. C., Dantas Saturnino, A. C. R., Coelho, L. C. B. B., y Batistuzzo de Medeiros, S. R. (2008). Determining the genotoxicity of an aqueous infusion of Bauhinia monandra leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4), 509–516. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400002>

- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., y Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Sisenando, H. A. A. A. C. N., Silva Macedo, M. F., Saturnino, A. C. R. D., Coelho, L. C. B. B., y Medeiros, S. R. B. de. (2009). Evaluation of the genotoxic potential of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL). *Food and Chemical Toxicology*, 47(2), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.11.010>
- Suryavanshi, A. W., y Suryavanshi, V. V. (2019). Extraction and isolation of clerodane as a bioactive molecule from *Tragia ramosa*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(3), 1135–1138. <https://www.researchgate.net/publication/338234265%0AExtraction>
- Swamy, T. A., Mutuku, N. C., Ngule, M. E., y Ramesh, F. (2010). Qualitative Analysis of Phytoconstituents in *Tragia brevipes* Plant. *International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis*, 3(2), 93–98.
- Thimmaiah Nivya, M., Patil, R. K., Advi Rao, G. M., Ajay S Khandagale, Somashekarappa, H., Ananda, D., Manjunath, H., y Joshi, C. G. (2019). Cytotoxicity based screening for radioprotective properties of methanolic extract of *Tragia involucrata* L. on cultured human peripheral lymphocytes exposed to gamma radiation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 57, 469–477. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/48482>
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J., y Sasaki, Y. F. (2000). Single Cell Gel / Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35, 206–221. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
- Tikkanen, L., Matsushima, T., y Natori, S. (1983). Mutagenicity of anthraquinones in the *Salmonella* preincubation test. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 116(3–4), 297–304. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(83\)90067-8](https://doi.org/10.1016/0165-1218(83)90067-8)
- Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., de la Cruz Rot, M., y Pardo-de-Santayana, M. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of*

- Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>
- Tropicos.org*. (2009a). Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/13900077>
- Tropicos.org*. (2009b). Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Name/13043415>
- Tropicos.org*. (2009c). Missouri Botanical Garden. <https://www.tropicos.org/name/12801898>
- Tropicos.org*. (2009d). Missouri Botanical Garden. <https://www.tropicos.org/name/29400099>
- Turkez, H., Arslan, M. E., y Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(10), 1089–1098. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
- Wang, S. Q., Zhang, Y. M., Liu, F., Wang, Q. Y., Yang, S. X., Wei, D. S., Sun, J. Z., He, S. L., Zhang, Y. X., Han, J. Y., y Qin, J. C. (2019). Chemical composition and allelopathic activity of essential oils from geranium wilfordii maxim. *Allelopathy Journal*, 48(1), 59–68. <https://doi.org/10.26651/allelo.j/2019-48-1-1244>
- Westendorf, J., Marquardt, H., Poginsky, B., Dominiak, M., Schmidt, J., y Marquardt, H. (1990). Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 240(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(90\)90002-J](https://doi.org/10.1016/0165-1218(90)90002-J)
- Xu, X., Nagarajan, H., Lewis, N. E., Pan, S., Cai, Z., Liu, X., Chen, W., Xie, M., Wang, W., Hammond, S., Andersen, M. R., Neff, N., Passarelli, B., Koh, W., Fan, H. C., Wang, J., Gui, Y., ... Wang, J. (2011). The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature Biotechnology*, 29(8), 735–741. <https://doi.org/10.1038/nbt.1932>
- Yang, X. M., Li, J. S., Huang, G. X., Li, Q. Q., y Yan, L. J. (2012). Study on potential toxic mechanism of chrysophanol binding DNA by saturation value binding DNA. *Asian Journal of Chemistry*, 24(2), 551–557.