

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO TOTAL DE *Pavonia sepioides* EN CULTIVOS *in vitro*
DE LINFOCITOS HUMANOS**

**LISETH ELIANA BOLAÑOZ LLANTEN
DANIELA YINETH ORTEGA ZUÑIGA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA
POPAYÁN, CAUCA
2013**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO TOTAL DE *Pavonia sepioides* EN CULTIVOS *in vitro*
DE LINFOCITOS HUMANOS**

**LISETH ELIANA BOLAÑOZ LLANTEN
DANIELA YINETH ORTEGA ZUÑIGA**

Documento del trabajo de grado presentado para optar al título de Biólogo

Director

**Silvio Marino Carvajal Varona
Magíster En Biología (Genética)**

Asesor

**Fabio Antonio Cabezas Fajardo
Doctor En Ciencias Químicas**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN TOXICOLOGÍA GENÉTICA Y CITOGENÉTICA
POPAYÁN, CAUCA
2013**

Nota de Aceptación

Silvio Marino Carvajal Varona Mg.
Director

Ingrid Yesenia Reyes Carvajal
Jurado

Nadia Nubia Maca Muñoz
Jurado

“A Nuestros Amados Padres y Hermanos”

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos infinitamente a Dios, por brindarnos el privilegio de vivir y habernos permitido culminar esta meta, acompañándonos siempre con su inmenso amor y bondad. A nuestros padres Blanca LLanten, Javier Bolaños, Jeovani Zúñiga y Leonardo Ortega, por su inmenso amor, apoyo incondicional, y maravilloso ejemplo de vida. A nuestros hermanos, por su compañía, apoyo y amor.

A nuestro profe Silvio Carvajal, por guiarnos con sus conocimientos, apoyo, motivación y bella amistad. A nuestro asesor Fabio Cabezas, por apoyarnos y brindarnos su conocimiento. A los jurados por su tiempo y asesoría. A todos los amigos, que nos acompañaron e hicieron nuestros días más felices. Al grupo de investigación en toxicología genética y citogenética por brindarnos con dedicación y disciplina todos sus conocimientos. A los maestros, que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario. A la universidad por haber permitido formarnos como biólogas. Y a todas esas personas que de alguna manera hicieron parte de esta bonita experiencia.

CONTENIDO

Resumen	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	3
3. JUSTIFICACIÓN	5
4. OBJETIVOS	7
4.1 OBJETIVO GENERAL	7
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
5. MARCO REFERENCIAL	8
5.1 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA	8
5.1.1 Clasificación taxonómica de la planta	8
5.1.2 Morfología de <i>Pavonia sepioides</i> . Fryxell & Krapov	9
5.1.3 Distribución	9
5.1.4 Usos Medicinales	10
5.2 ANTECEDENTES	10
5.3 PRUEBA DE CITOTÓXICIDAD	15
5.3.1 Índice Mitótico	15
5.4 PRUEBA DE GENOTÓXICIDAD	16
5.4.1 Alteraciones Cromosómicas	16
5.5 LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFERICA COMO MODELO BIOLÓGICO	16
5.6 MÉTODO DE EXTRACCIÓN	17
5.6.1 Extracto etanólico	17
5.6.2 Extracción continua sólido-líquido (Soxhlet)	17

5.6.3	Proceso de Rota-evaporación	18
5.7	CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS DE <i>Pavonia sepioides</i>	19
6.	MARCO METODOLÓGICO	24
6.1	ENCUESTA ETNOBOTÁNICA SOBRE <i>Pavonia sepioides</i>	24
6.2	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	25
6.3	CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFERICA	26
6.3.1	Obtención de la muestra de sangre	26
6.3.2	Siembra de linfocitos humanos	27
6.3.3	Tratamiento de los cultivos	27
6.3.4	Cosecha de linfocitos humanos	27
6.3.5	Preparación de los extendidos celulares	27
6.3.6	Coloración directa con giemsa	28
6.4	PROTOCOLOS EXPERIMENTALES	28
6.4.1	Análisis previo de índice Mitótico para elegir las concentraciones alta, media y baja del extracto	28
6.4.2	Prueba de citotoxicidad	28
6.4.3	Prueba de genotoxicidad	29
6.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
6.5.1	Tipo de estudio	29
6.5.2	Variables	30
6.5.3	Prueba de citotoxicidad (IM)	30
6.5.4	Prueba de genotoxicidad (AC)	31
6.5.5	Pruebas estadísticas	31
7.	RESULTADOS	32
7.1	ANÁLISIS PREVIO DE ÍNDICE MITÓTICO PARA ELEGIR LAS CONCENTRACIONES ALTA, MEDIA Y BAJA DEL EXTRACTO DE <i>Pavonia sepioides</i>	32

7.2	PRUEBA DE CITOTOXICIDAD	34
7.3	PRUEBA DE GENOTOXICIDAD	37
8.	DISCUSIÓN	45
8.1	PRUEBA DE CITOTOXICIDAD	45
8.2	PRUEBA DE GENOTOXICIDAD	48
9.	CONCLUSIONES	51
10.	RECOMENDACIONES	52
11.	BIBLIOGRAFÍA	53
	ANEXO	

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Imágenes de <i>Pavonia sepioides</i> .	8
Figura 2	Distribución de <i>Pavonia sepioides</i> . Fryxell & Krapov.	9
Figura 3	Montaje del método de extracción Soxhlet.	18
Figura 4	Rota-evaporador	19
Figura 5	Estructura básica de los flavonoides.	20
Figura 6	Clasificación de flavonoides.	21
Figura 7	Estructura básica de las cumarinas.	22
Figura 8	Estructura del isopreno	22
Figura 9	Estructura general de cardiotónicos.	23
Figura 10	Porcentaje de personas encuestadas que conocen y desconocen los usos medicinales de <i>Pavonia sepioides</i>	24
Figura 11	Protocolo experimental para la prueba de citotóxicidad.	28
Figura 12	Protocolo experimental para la prueba de genotóxicidad	29
Figura 13	Curva de mejor ajuste que explica la asociación entre las	34

concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* y el Índice mitótico, en linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

- Figura 14** Curva de mejor ajuste que explica la asociación entre las concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* y el Índice mitótico, en linfocitos humanos cultivados *in vitro*. 37
- Figura 15** Curva de mejor ajuste que explica la asociación entre las concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* y las alteraciones cromosómicas totales, en linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*. 41
- Figura 16** Imagen de metafase normal, Microscopio Nikon (100X). 42
- Figura 17** Imágenes de rupturas cromatídicas, Microscopio Nikon (100X). 43
- Figura 18** Imágenes de cromosomas dicéntricos (rupturas cromosómicas), Microscopio Nikon (100X). 44

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Concentración de las soluciones de trabajo del extracto etanólico total de <i>Pavonia sepioides</i> empleadas para elegir las concentraciones alta, media y baja utilizadas en la prueba de citotoxicidad y genotoxicidad.	26
Tabla 2	Identificación de las variables de la investigación.	30
Tabla 3	Promedio de Índice Mitótico obtenido al tratar los linfocitos humanos cultivados <i>in vitro</i> con ocho concentraciones del extracto de <i>Pavonia sepioides</i> , un control negativo (Agua Estéril) y un control positivo (MMC).	33
Tabla 4	Promedio de Índice mitótico obtenido al tratar los linfocitos humanos de sangre periférica, cultivados <i>in vitro</i> , con tres concentraciones del extracto de <i>Pavonia sepioides</i> , un control negativo (Agua Estéril) y un control positivo (MMC).	35
Tabla 5	Número promedio de Alteraciones Cromosómicas/100 células, obtenido al tratar los linfocitos humanos de sangre periférica cultivados <i>in vitro</i> , con tres concentraciones del extracto de <i>Pavonia sepioides</i> , un control negativo (Agua Estéril) y un control positivo (MMC).	40

ABREVIATURAS

IM: Índice mitótico

MMC: Mitomicina C

AC: Alteraciones Cromosómicas

AC/100 células: Alteraciones Cromosómicas encontradas en 100 células

mg/mL: Miligramos sobre mililitros

TLC: Cromatografía de capa delgada

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

H1: Hipótesis Alternativa

Ho: Hipótesis Nula

RESUMEN

Gran parte de la población mundial utiliza la medicina tradicional, incluyendo plantas medicinales como tratamiento alternativo para sus necesidades primarias de salud, siendo *Pavonia sepioides* (Malvaceae) una de ellas. En este proyecto se evaluó la actividad citotóxica y genotóxica de esta planta, utilizando su extracto total para probar su efecto sobre linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*. Se realizaron cultivos de linfocitos, los cuales fueron tratados con diferentes concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* (alta: 2,63 mg/ml; media: 1,32 mg/ml; baja: 0,66 mg/ml), conjuntamente se tuvo como cultivos de referencia, un control negativo tratado con agua estéril y un control positivo tratado con Mitomicina C. En dichos cultivos se midió el índice mitótico (IM) indicativo de citotoxicidad y la frecuencia de alteraciones cromosómicas (AC) como biomarcador de genotoxicidad. Se identificó efecto citotóxico mediante bloqueo premitótico dependiente de la dosis; es decir que el incremento en las concentraciones de *Pavonia sepioides* disminuyeron el Índice Mitótico en forma significativa ($P=0,001$); además, se identificó efecto genotóxico dependiente de la dosis del extracto, ya que a mayor concentración de *P. sepioides* se eleva significativamente ($P=0,0001$) la frecuencia de Alteraciones Cromosómicas. En conclusión se puede decir que *Pavonia sepioides* tiene efectos biológicos sobre linfocitos humanos cultivados *in vitro*. Dichos efectos posiblemente se generan por la acción de los compuestos químicos presentes en el extracto total y por ende resulta necesario realizar estudios más detallados sobre esta planta medicinal, que permitan generar más conocimiento sobre sus propiedades toxicológicas y clínicas.

Palabras clave: Citotóxicidad, Genotóxicidad, Extracto, Cultivo *in vitro*, Biomarcador, *Pavonia sepioides*.

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la medicina tradicional es considerada como conocimientos, creencias, prácticas y enfoques diversos, que incorporan medicinas basadas en plantas, animales y/o minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios aplicados de forma individual o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades [1]. En los últimos años el interés de las personas por la medicina tradicional se ha incrementado y gran parte de la población mundial la utiliza como tratamiento alternativo para sus necesidades primarias de salud, no solo por su fácil acceso, sino también porque es generalmente más aceptable desde el punto de vista cultural y espiritual [2]; según la OMS (2002) alrededor del 90% de la población de los países en desarrollo utiliza la medicina tradicional; por ejemplo, en países como Uganda, Tanzania, Rwanda, India, Etiopía, Chile y Colombia, la población que utiliza este tipo de medicina oscila entre el 40% y 90% [3] [1].

Dentro de la medicina tradicional el uso de plantas es tal vez el más sobresaliente, puesto que en las plantas el hombre ha encontrado una amplia gama de beneficios para su salud. Además del uso intuitivo y empírico que se le ha dado a las plantas a través de la historia [4], en la actualidad, investigaciones científicas en todo el mundo han demostrado que los extractos de plantas tienen una variedad de efectos farmacológicos, entre los que se incluyen: efectos antiinflamatorios, vasodilatadores, antimicrobiales, anticonvulsiantes, sedantes y antipiréticos [1].

Las propiedades farmacológicas de las plantas medicinales se atribuyen a moléculas bioactivas presentes en todas sus estructuras (tallo, hojas, flores, frutos, raíz y semillas), las cuales han evidenciado un efecto fisiológico en muchas de las poblaciones que las consumen; es por esto que el uso de estas plantas continúa siendo una parte muy arraigada de la cultura, historia y creencias de un país [1].

En Colombia se encuentran entre 35.000 y 50.000 especies vegetales, y de ellas aproximadamente 5.000 han sido utilizadas por los indígenas y campesinos para combatir el amplio espectro de enfermedades a los que se ven expuestos. No obstante, las plantas medicinales pueden resultar nocivas y peligrosas sino se tiene un control adecuado sobre su consumo [5]. A pesar de las profundas ventajas terapéuticas que poseen las plantas medicinales, algunos constituyentes de las mismas han demostrado ser potencialmente tóxicos, carcinógenos y teratógenos [6]. Se sabe que algunas sustancias químicas presentes en las plantas pueden ser bioactivadas y posiblemente son responsables de promover el desarrollo de enfermedades, por ejemplo, el cáncer [7] [8].

Las plantas medicinales de uso en Colombia pertenecen a 202 familias botánicas [9], entre las cuales se encuentra la familia Malvaceae; esta familia posee 243 géneros y 4225 especies y *Pavonia* probablemente representa el género más grande de la familia Malvaceae, abarcando alrededor de 250 especies, de las cuales aproximadamente 224 se reconocen para América [10] [11]. Una de estas plantas es *Pavonia sepioides*, utilizada con fines medicinales en la región andina Colombiana, pero de la cual no se han reportado estudios que corroboren sus propiedades terapéuticas o su posible toxicidad. En este trabajo se evaluó la actividad biológica del extracto total de *Pavonia sepioides*, en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, con el propósito de identificar algunas propiedades toxicológicas de la planta; para ello se evaluó su citotoxicidad mediante la prueba de Índice Mitótico y su genotoxicidad mediante la prueba de Alteraciones Cromosómicas.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

Las plantas han sido la base de la medicina tradicional desde muchos años atrás y seguirán proporcionando a la humanidad nuevos medicamentos; sin embargo, algunas de las propiedades terapéuticas atribuidas a las plantas han demostrado ser erróneas [12], puesto que las plantas suelen contener mezclas complejas de diferentes compuestos químicos que incluyen: ácidos grasos, esteroides, alcaloides, flavonoides, glicósidos, saponinas, taninos, terpenos, entre otros. Cualquiera de los componentes mencionados puede tener actividad biológica en humanos actuando individualmente, de forma aditiva o sinérgica [13]. Una sola planta, por ejemplo, contiene sustancias amargas que estimulan la digestión, compuestos anti-inflamatorios que reducen la hinchazón y el dolor, compuestos fenólicos que actúan como antioxidantes, antimicóticos y antibacteriales, pero que además han reportado toxicidad [12], es por esta razón que debe tenerse en cuenta la dosis a la que se está expuesto cuando se desea tratar alguna enfermedad, debido a que las estructuras químicas de los componentes presentes en los extractos pueden estar generando toxicidad en la célula [4], en consecuencia, el uso descontrolado de plantas medicinales puede representar un riesgo potencial para la salud.

En términos relativos, son pocos los países que han desarrollado una política de control sobre la medicina tradicional y los sistemas nacionales de inspección para controlar y valorar los efectos adversos de las plantas medicinales son escasos. Por ello, a pesar de que muchas terapias de la medicina tradicional tienen un potencial prometedor y se utilizan cada vez con más frecuencia, muchas de ellas no están probadas y su uso no está controlado. Como resultado, los conocimientos sobre los posibles efectos secundarios son limitados [1]; este es el caso de *Pavonia sepioides*, empleada con usos medicinales en la región andina, principalmente en los departamentos del Huila, Nariño y Cauca [14], pero sin tener el suficiente y adecuado conocimiento sobre su composición, dosificación y

posibles efectos adversos; por ejemplo, en el Cauca, en los municipios de El Tambo y Argelia se encontró que de 60 personas encuestadas el 68,33% conocen sobre los usos medicinales de esta planta (Figura 10), pero no sobre sus propiedades toxicológicas. Es entonces de gran importancia realizar bioensayos de citotoxicidad y genotóxicidad que permitan conocer los potenciales riesgos del consumo de esta planta.

En esta investigación se trata de resolver sí: ¿El extracto etanólico total de las hojas de *Pavonia sepioides*, tiene actividad citotóxica y/o genotóxica en linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*?

Por lo tanto, en esta investigación se sometieron a prueba las siguientes hipótesis:

Si el extracto de *Pavonia sepioides* (Malvaceae) tiene efecto citotóxico para los linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*, entonces se espera que el Índice Mitótico de los cultivos tratados con el extracto se reduzca (H1), de lo contrario, se espera que el IM permanezca semejante al control negativo no tratado con el extracto (H₀).

Si el extracto de *Pavonia sepioides* (Malvaceae), tiene efecto genotóxico para los linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*, entonces, al tratarlos con tres concentraciones del extracto, se espera que se incremente significativamente la frecuencia de alteraciones cromosómicas en los linfocitos tratados, respecto al control negativo no tratado (H1), de lo contrario, la frecuencia de alteraciones cromosómicas permanecerá semejante al control negativo no tratado (H₀).

3. JUSTIFICACIÓN

En el mundo muchas especies vegetales han sido fuente de compuestos químicos bioactivos de los cuales se han desarrollado medicamentos [15] [16]; se sabe que uno de cada cuatro medicamentos dispensados en las oficinas de farmacia de los Estados Unidos, contiene extractos de plantas o principios activos derivados de plantas superiores, y que al menos 119 sustancias químicas consideradas como medicamentos importantes actualmente en uso en varios países, derivan de 90 especies de plantas [17].

Entonces, con la evidenciada importancia de las plantas en la salud humana y teniendo en cuenta el aumento de la utilización de estas como parte de algunos sistemas médicos tradicionales, se ha incrementado también la necesidad de producir evidencia científica sobre la seguridad y eficacia de los productos que consumen empíricamente las personas de los países en los cuales la medicina tradicional está muy arraigada. Esto es debido a que la mayor parte del material vegetal medicinal utilizado tradicionalmente por la población, no ha sido estudiado en cuanto a su potencial tóxico o mutagénico [18]. Teniendo en cuenta que los agentes mutagénicos y carcinogénicos son omnipresentes en el entorno y sabiendo que el daño del ADN se produce en todo el ciclo de vida de un organismo a causa de factores exógenos y endógenos [19], resulta pertinente realizar bioensayos que arrojen resultados sobre la actividad Citotóxica y Genotóxica de extractos vegetales.

En Colombia, al ser un país muy diverso, tanto en cultura como en recursos naturales, se ha utilizado las plantas como recurso para atender necesidades primarias de salud. No obstante, los estudios científicos sobre plantas medicinales han sido escasos, por lo que resulta importante realizar investigaciones de este tipo, que permitan informar a la población colombiana y mundial, sobre algunas de

las propiedades toxicológicas que poseen las plantas que consumen en dichos tratamientos alternativos.

Entonces, los ensayos de citotoxicidad y genotoxicidad se deberían realizar con todas las plantas que la población utiliza [20], para verificar los beneficios de dichas plantas o conocer sus posibles perjuicios. Al ser *Pavonia sepioides* una de las plantas empleadas como medicina tradicional en la región andina colombiana y de la cual no se tienen reportes sobre su toxicidad, este trabajo aporta conocimiento acerca de la actividad toxicológica del extracto de esta planta, en cuanto a citotoxicidad y genotoxicidad generadas sobre los linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*, y por lo tanto se podría determinar si las moléculas biológicamente activas presentes en esta especie, generan inestabilidad genética y en consecuencia, se incrementa la probabilidad de desarrollo de enfermedades como el cáncer.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar, *in vitro*, la actividad citotóxica y genotóxica del extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* (Malvaceae), en linfocitos humanos de sangre periférica.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Obtener el extracto etanólico total de las hojas de *Pavonia sepioides* (Malvaceae) a través de la extracción continua sólido-líquido (Soxhlet).
- ❖ Determinar la actividad citotóxica del extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* (Malvaceae) sobre linfocitos humanos cultivados *in vitro*, mediante la prueba de Índice Mitótico (IM).
- ❖ Determinar la actividad genotóxica de extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* (Malvaceae) sobre linfocitos humanos cultivados *in vitro*, mediante la prueba de Alteraciones Cromosómicas (AC).

5. MARCO REFERENCIAL

5.1 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

5.1.1 Clasificación taxonómica de la planta [21].

Nombre Científico: *Pavonia sepioides*

Nombre Común: Cadillo

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Súper orden: Rosanae

Orden: Malvales

Familia: Malvaceae

Género: *Pavonia*

Epíteto Específico: *sepioides*

Autor Epíteto Específico: Fryxell & Krapov.

Determinador: Fryxell, P. A.

Fecha determinación: 1995



Figura 1. Imágenes de *Pavonia sepioides*.

5.1.2 Morfología de *Pavonia sepioides*. Fryxell & Krapov. El cadillo (*Pavonia sepioides*) perteneciente a la familia Malvaceae, tiene hábito subarborescente (hierba), posee ramas cilíndricas puberulentas con tricomas fasciculados, en las cuales se encuentran sus hojas verdes membranosas, de forma ovada, base redondeada, ápice agudo y margen aserrado, ubicadas en posición alterna-espiral. La flor se encuentra particularmente en inflorescencias axilares múnadas (flor solitaria), tienen un pedúnculo largo (3-6cm), son poco pubescentes, de color amarillo intenso, con estambres libres monadelfos distribuidos a lo largo de un tubo largo y glabro, en cuyo interior se encuentran los estilos (10 estilos) que llegan hasta el ovario penta-ocular (un óvulo por lóculo), posee tres aristas largas de 5mm aproximadamente. El fruto es una capsula loculicida o un esquizocarpo [22].

5.1.3 Distribución. *Pavonia sepioides* es una especie que se encuentra en Suramérica, predominando entre los 1000-2000 msnm en países como Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia. En Colombia esta planta es propia de zonas de bosque húmedo premontano, encontrándose con frecuencia en los departamentos de Antioquia, Quindío, Huila, Nariño, Valle del Cauca y Cauca [21] [23] [24].

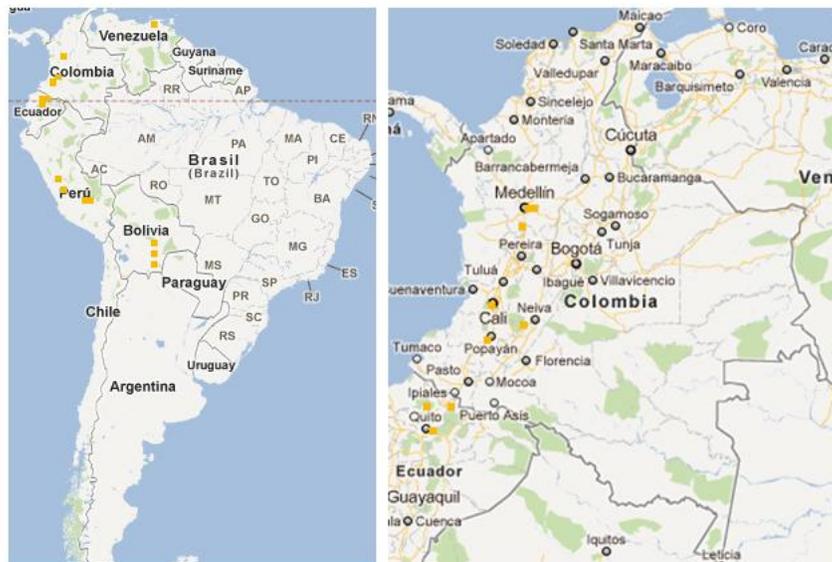


Figura 2. Distribución de *Pavonia sepioides*. Fryxell & Krapov [23].

5.1.4 Usos Medicinales. Esta planta es empleada como tratamiento alternativo para algunas molestias del sistema digestivo, tales como:

- ❖ **Constipación:** Se maceran las hojas mezclándolas con agua y se toma adicionando unas gotas de zumo limón (preferiblemente se tamiza).
- ❖ **Cólicos abdominales:** se prepara una infusión con las hojas y flores; se toma tibio.

También se utiliza como:

- ❖ **Expectorante:** se prepara una decocción de las hojas en agua y miel.
- ❖ **Tratamiento capilar:** se maceran las hojas en agua hasta obtener una mezcla espesa que se aplica sobre el cabello, mejorando así su brillo e hidratación.

5.2 ANTECEDENTES

Las terapias que implican el uso de las plantas están basadas en los hallazgos empíricos de cientos y miles de años. Los primeros registros fueron escritos en tablillas de arcilla, utilizando la escritura cuneiforme de Mesopotamia que datan de 2600 aC. Entre las sustancias que se utilizaron se destacan los aceites de *Cupressus sempervirens* (Ciprés), *Glycyrrhiza glabra* (regaliz) y de algunas especies de *Commiphora myrrha* (mirra), los cuales son todavía usados para el tratamiento de dolencias tales como: los resfriados, infecciones por parásitos e inflamación [12].

Hoy en día, el interés en la naturaleza como fuente de posibles fármacos está aumentando, debido a que los productos naturales y sus derivados representan más del 50% de todos los fármacos en uso clínico y las plantas superiores constituyen al menos el 25% [12], es por ello que se ha implementado una gran batería de pruebas que permiten conocer o corroborar las propiedades medicinales de diversas especies de plantas.

Entre estas pruebas se encuentran los ensayos citogenéticos y toxicológicos, herramientas que se han empleado cada vez con más frecuencia en todo el mundo para el análisis de plantas. De estos análisis son de destacar:

❖ **Aplicación De Una Metodología “*In Vitro*” Para Evaluar la Toxicidad de Extractos Vegetales.** Barbosa. H.J. Arias, D. (Colombia, 1995). En este estudio se evaluó el efecto de cinco extractos de plantas medicinales (*Curatella americana*, *Pentacalia vaccinoides*, *Thevetia neriifolia*, *Bidens pilosa*, *Viburnum toronis*) los cuales mostraron influencia sobre el ciclo celular de linfocitos aislados de sangre periférica.

Se presentaron fenómenos comunes en todos los extractos como la destrucción celular, dependiente de la concentración. Las malformaciones celulares y cromosómicas, probablemente se deben a un efecto directo de las estructuras del extracto sobre la condensación de la cromatina o una alteración de los genes que codifican para proteínas que intervienen en la condensación de la cromatina [4].

❖ **In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*.** L. Gadano, A. Gurni, A. López, P. Ferraro, G. Carballo, M. (Argentina, 2002). Los resultados obtenidos sugieren una fuerte interacción entre los principios activos del extracto acuoso y el ADN. Se demostró que *Chenopodium ambrosioides* induce daño genético en las condiciones experimentales ensayadas para ICHs, AC,IM [25].

❖ **Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs.** Romero-Jiménez, M. Campos, J. Analla, M. Muñoz, A. Alonso, Á. (España, 2005). Todas las plantas evaluadas mostraron potencial antimutagénico contra peróxido de hidrógeno, como oxidante genotóxico en *Drosophila melanogaster*. Los resultados obtenidos para *Matricaria chamomilla*, *Tilia cordata*, *Mentha piperita*, *Mentha pulegium*, *Uncaria tomentosa* y *Valeriana officinalis* demostraron que existen compuestos bioactivos presentes en los extractos; entre estos compuestos se encuentran los fenoles, conocidos por su capacidad de eliminar especies reactivas de oxígeno [7].

❖ **Antigenotoxic role of *Centella asiatica* L. extract against cyproterone acetate induced genotoxic damage in cultured human lymphocytes.** Siddique, Y.H. Ara, G. Faisal, M. Ahmad, M. Afzal, M. (India, 2007). Los resultados del estudio revelan que las dosis seleccionadas del extracto de la planta, no presentaron genotoxicidad, pero si redujeron el daño genotóxico del acetato de cyproterone (CPA) en linfocitos humanos cultivados *in vitro* [8].

❖ **Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn.** Akinboro, A. Bakare, A. (Nigeria, 2007). Los resultados sugieren que los extractos de *Azadirachta indica* (A. Juss), *Morinda lucida* (Benth.), *Cymbopogon citratus* (DC Stapf.), *Mangifera indica* (Linn.) y *Carica papaya* (Linn.) poseen actividad inhibitoria, mitodepresiva y turbagénica sobre el crecimiento de las raíces de *Allium cepa*, además alteran la división celular y el comportamiento de los cromosomas de *Allium cepa* [6].

❖ **Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of *Cordia ecalyculata* and *Echinodorus grandiflorus*.** Da Silva, C.J. Kenupp, B. J, Satie, C.T (Brazil, 2009). Según los resultados obtenidos, se concluye que los extractos crudos de *Cordia ecalyculata* y *Echinodorus grandiflorus*, no poseen

efecto clastogénico o citotóxico en células de medula ósea de ratón (*Mus musculus*) [26].

❖ **Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of *Codium tomentosum* Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes *in vitro*. Celikler, S. Vatan, O. Yildiz, G. Bilaloglu, R. (Turkia, 2009).** La citotoxicidad fue estadísticamente no significativa en cultivos de linfocitos humanos. Lo que sugiere que el extracto etanólico de *Codium tomentosum* Stackhouse presenta un bajo efecto citotóxico en linfocitos humanos cultivados *in vitro*. La función antioxidante de las moléculas bioactivas del extracto etanólico de *Codium tomentosum* Stackhouse (CTE), en la reducción de clastogenicidad, se debe posiblemente a la inducción de las enzimas de fase II, tales como la superóxido dismutasa y catalasa además de la interacción de biomoléculas de ADN con moléculas presentes en el extracto [27].

❖ **Estudio preliminar de la citotoxicidad y la genotoxicidad de un extracto de origen vegetal conocido como palmo rosado en células meristemáticas de *Allium cepa*. Freyre, S. Estrada, M. Bolaños, H. (Colombia, 2009).** Se encontró que variables como el crecimiento radicular, el índice mitótico, la morfología radicular y la aparición de alteraciones cromosómicas se ven afectadas al exponer los meristemas radiculares de cebolla a la fracción acuosa del palmo rosado, por lo que se puede concluir que existe actividad citotóxica y genotóxica de la fracción acuosa del palmo rosado sobre meristemas de *Allium cepa* [28].

❖ **The genotoxic and antigenotoxic effects of *Aloe vera* leaf extract *in vivo* and *in vitro*. Kayraldiz, A. Kocaman, A.Y. Rencüzoğullari, E. Istifli, E. Hasan Basrilla. Topaktaş, M. Dağlioğlu, Y. (Turkia, 2010).** El extracto de las hojas de *Aloe vera* muestra efecto genotóxico y citotóxico *in vivo*, *in vitro*, y en los sistemas de prueba de Microsoma/Salmonela. El extracto de *Aloe vera* es capaz

de incrementar los efectos mutagénicos de EC (Ethylcarbamate, urethane) y MMC (Mitomicina C). Por consiguiente, se puede concluir que el extracto de *Aloe vera* es un mutágeno potencial [29].

❖ **Genotoxic and antigenotoxic effects of *Hemidesmus indicus* root extract in cultured lymphocytes.** Ananthi, R. Chandra, N. Santhiya, S. T. Ramesh, A. (India, 2010). Esta investigación ha demostrado que el extracto etanólico de *Hemidesmus indicus* puede inhibir la genotoxicidad del cisplatino a bajas concentraciones, pero es altamente citotóxico y puede ser probablemente genotóxico a altas concentraciones [30].

❖ **Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru.** Bussmann, R. W. Malca, G. Glenn, A. Sharon, D. Nilsen, B. Parris, B. Dubose, D. Ruiz, D. Saleda, J. Martinez, M. Carillo, L. Walker, K. Kuhlman, A. Townesmith, A. (Peru, 2011). En esta investigación se evaluó gran cantidad de especies de plantas, entre ellas algunas pertenecientes a la familia Malvaceae. Los resultados demostraron que más del 75% de las especies estudiadas posee cierto potencial citotóxico [20].

❖ **Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes.** Montoro, A. Soriano, J. M. Barquintero, J. F. Almonacid, M. Verdú, G. Sahuquillo, V. Villaescusa, J. I. Sebastià, N. (España, 2011). En este estudio hubo un incremento estadísticamente significativo de intercambios de cromátides hermanas y Alteraciones Cromosómicas causado por las altas concentraciones del extracto etanólico de propóleo, además, se observó que las altas concentraciones del extracto reducen significativamente los valores de Índice Mitótico e Índice de proliferación celular [31].

❖ **Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae).** Martínez, M. Ocampo, D. Galvis, J. Valencia, A. (Colombia, 2011). La actividad citotóxica reportada se debe al efecto sinérgico del conjunto de metabolitos secundarios presentes en la planta, tales como alcaloides y terpenos. Explicando así la toxicidad mostrada por la fracción de alcaloides totales [32].

❖ **Genotoxicity assessment of *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells in vivo.** Marques, E. Silva, S. Niero, R. Andrade, S. Rosa P. Perazzo, F. Maistro, E. (Brazil, 2012). Los resultados muestran que, bajo las condiciones experimentales de este estudio, el extracto de las semillas de *Garcinia achachairu* no presenta efecto genotóxico o clastogénico en células de médula ósea de ratón, incluso teniendo en cuenta las altas dosis probadas [33].

5.3 PRUEBA DE CITOTÓXICIDAD

5.3.1 Índice Mitótico. El índice mitótico es considerado como biomarcador de citotoxicidad [34], que permite determinar si una sustancia tiene efecto bloqueador premitótico (si el IM decrece) ó mitótico (si el IM aumenta). El índice mitótico es la proporción o frecuencia relativa de células en mitosis de la población celular analizada [35]. Se calcula mediante la fórmula:

$$\text{IM (\%)} = (\text{número de células en mitosis} / \text{total de células}) * 100$$

En este estudio, el índice mitótico es la proporción de células en metafase entre un total de 1000 células contadas por cultivo [36].

5.4 PRUEBA DE GENOTÓXICIDAD

5.4.1 Alteraciones Cromosómicas. Consisten en el exceso o deficiencia en la cantidad de material genético, ya sea por el cambio en el número de cromosomas o en su estructura (deleciones, duplicaciones y rearrreglos) [37] [38]. La mayor parte de las alteraciones cromosómicas observadas en las células son letales, pero existen muchas alteraciones que son viables y pueden causar efectos genéticos, ya sean somáticos o heredados [8] [39]. Son la consecuencia biológica de la exposición humana a agentes genotóxicos (químicos o físicos) [40] [41]. Su uso, en ensayos *in vitro*, ha sido durante mucho tiempo parte de la batería de pruebas de genotoxicidad, debido a que es muy sensible y permite detectar exposición a mutágenos y carcinógenos que pueden producir inestabilidad genética [31] [42] [43].

En este estudio se hizo seguimiento principalmente a alteraciones cromatídicas, cromosómicas y rearrreglos como: anillos, dicéntricos, cuadrirradios y trirradios.

5.5 LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA COMO MODELO BIOLÓGICO

Los linfocitos humanos son un subgrupo de células sanguíneas. Estos se encuentran circulando en la sangre y permanecen extravascularmente en los órganos, en el torrente linfático y principalmente en los órganos linfáticos, nudos linfáticos y el bazo. Normalmente, los linfocitos se encuentran en estado G0 (estado de no división) y tienen un promedio de vida en circulación de meses y años, pudiendo así acumular daños por exposición a agentes genotóxicos. Si los linfocitos son inducidos a entrar en el ciclo de división celular por medio de un estímulo inmunológico con el antígeno hemaglutinina, la síntesis de proteínas se incrementa aumentando el volumen celular debido a la entrada en la etapa G1 de la división [44] [45].

Este conocimiento a convertido a los linfocitos en un sistema centinela para el estudio del ciclo de división celular y del proceso de replicación de ADN, permitiendo investigar el efecto que pueden ejercer ciertos tóxicos ambientales sobre el funcionamiento normal de la célula (citotoxicidad) ó sobre su material genético (genotóxicidad), ya sea *in vitro* ó *in vivo* [44] [46].

5.6 MÉTODO DE EXTRACCIÓN

5.6.1 Extracto etanólico. Mezcla de compuestos secundarios obtenido después de exponer tejidos vegetales al etanol [47].

5.6.2 Extracción continua sólido-líquido (Soxhlet). Es un método de extracción continuo que se utiliza para materiales sólidos. Consiste en colocar el material a extraer, previamente molido y pesado, en un cartucho de celulosa que se introduce en la cámara de extracción conectada, por una parte, a un balón de destilación y por otra, a un refrigerante. El disolvente contenido en el balón se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el material. Cuando alcanza el nivel conveniente sifona por el tubo regresando al balón. El proceso se repite hasta conseguir el agotamiento deseado del material (figura 3) [48] [49].

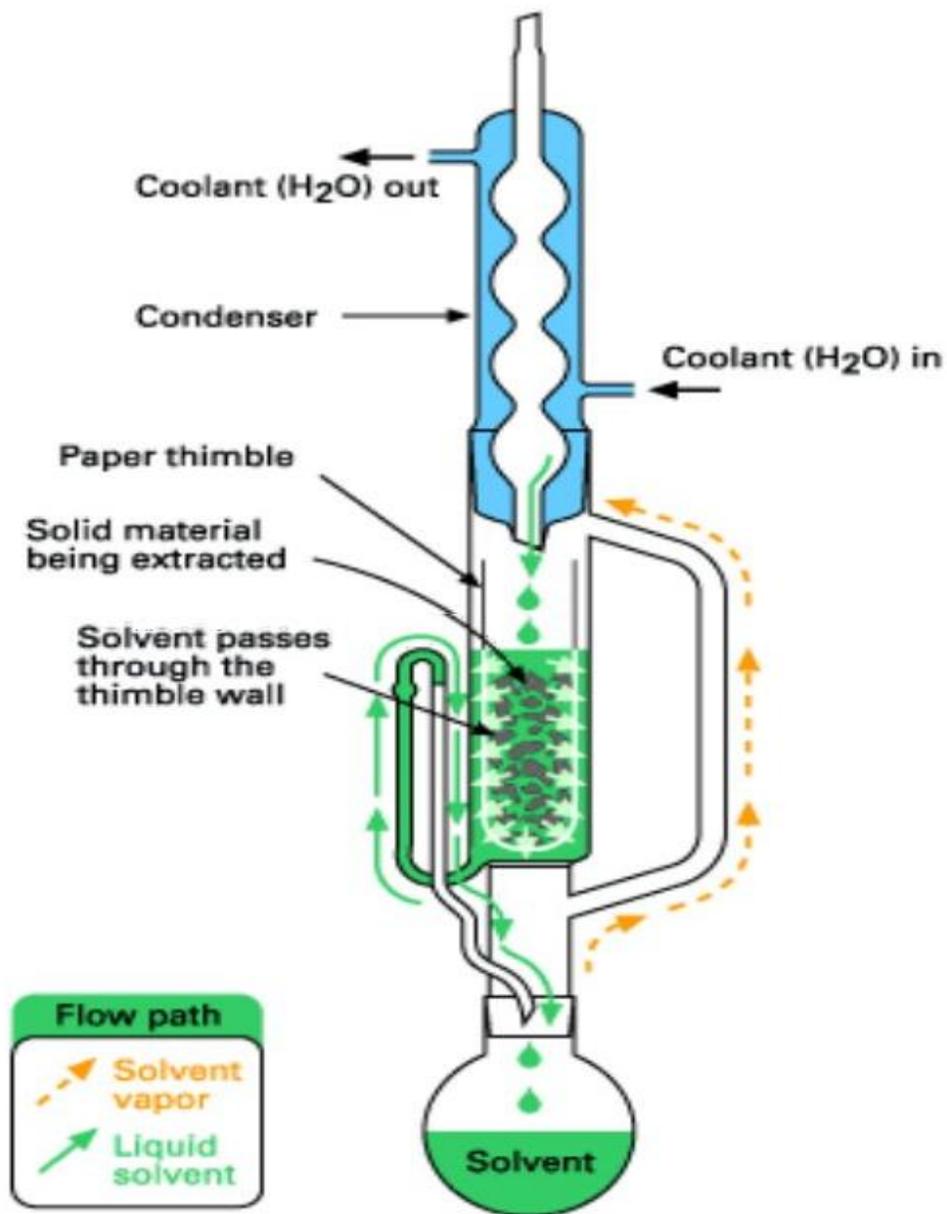


Figura 3. Montaje del método de extracción Soxhlet [48].

5.6.3 Rota-evaporación. Proceso mediante el cual un extracto es concentrado al vacío en un rota-evaporador (figura 4). Este proceso permite retirar el disolvente del extracto [49] [50].

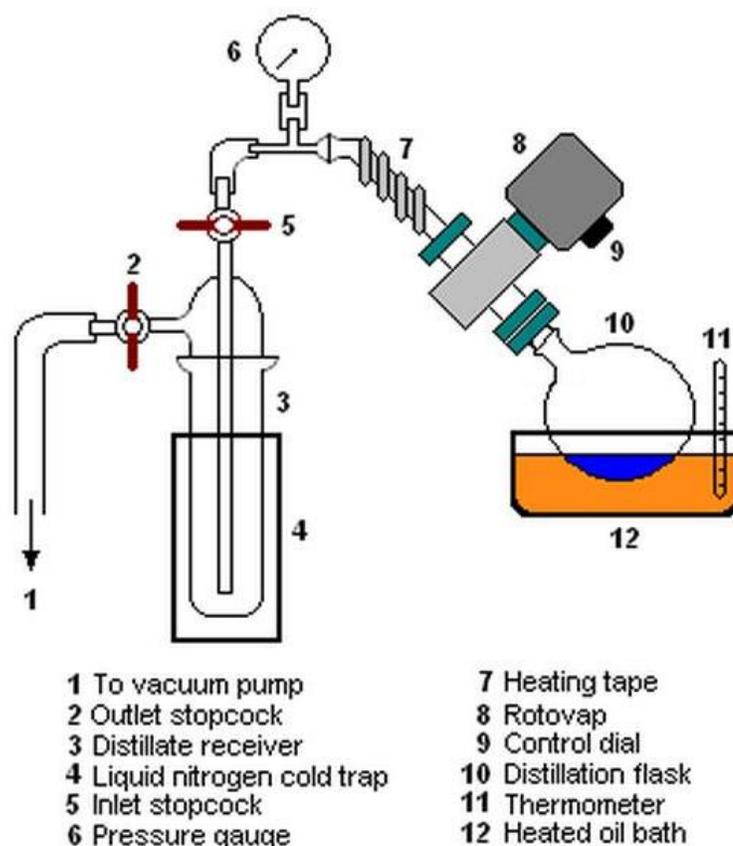


Figura 4. Rota-evaporador [51].

5.7 CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS DE *Pavonia sepioides*.

El uso de plantas medicinales está basado en conocimientos empíricos de las poblaciones que las consumen y sus propiedades farmacológicas han sido, desde siempre, muy apreciadas por las personas, aun cuando no se tenía claro el porqué de dichas propiedades; actualmente se sabe que las propiedades medicinales de las plantas son responsabilidad de algunos grupos de sustancias de diversa composición química conocidas como metabolitos secundarios, o sea, productos de procesos resultantes de la asimilación de nitrógeno [52]. Estos metabolitos son compuestos químicos de estructura relativamente compleja, distribución restringida y característicos de fuentes botánicas específicas [53].

Los metabolitos secundarios que se encuentran presentes en la plantas se agrupan en tres grandes grupos con base a su origen biosintético: **compuestos fenólicos** (taninos, fitoestrógenos y cumarinas); **compuestos nitrogenados** (alcaloides, glicósidos cianogenéticos, glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lectinas e inhibidores de la proteasas); y **terpeno** (lactonas sesquiterpénicas, glicósidos cardíacos, saponinas); además de hidrocarburos poliacetilenicos y oxalatos.

Para el extracto total de *Pavonia sepioides*, el tamizaje fitoquímico resultó positivo para flavonoides, cumarinas, cardiotónicos, triterpenos y esteroides [14].

❖ **Flavonoides:** son un sustancias de bajo peso molecular que poseen un esqueleto carbonado C₆-C₃-C₆ [54], pertenecientes a los compuestos polifenólicos de origen vegetal; estos representan un grupo muy heterogéneo donde su estructura y función están estrechamente relacionadas [55].

Los flavonoides han mostrado actividad biológica interesante tal como antioxidante, antiviral, antifungal, anticancerosa, antiangiogenico y actividad inflamatoria [56] [57] [58] [59].

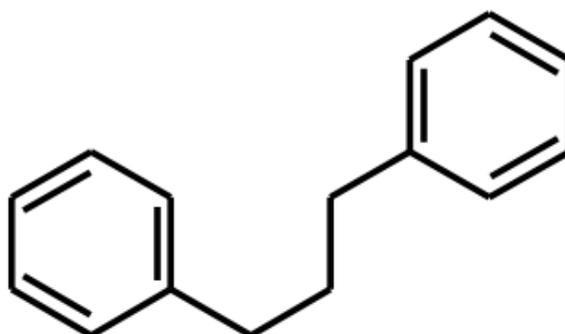


Figura 5. Estructura básica de los flavonoides [60] [61].

En la figura 5 puede observarse que, de manera general, son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (ó aromáticos, para los químicos orgánicos) unidos a

través de una cadena de tres átomos de carbono. Puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos C₆C₃C₆ [60].

En función del grado de saturación y de la apertura o no del anillo central pirano, los flavonoides se clasifican en flavanoles, flavonas, isoflavonas, antocianidinas, chalconas, flavanonas y flavonoles (Figura 6) [60] [61].

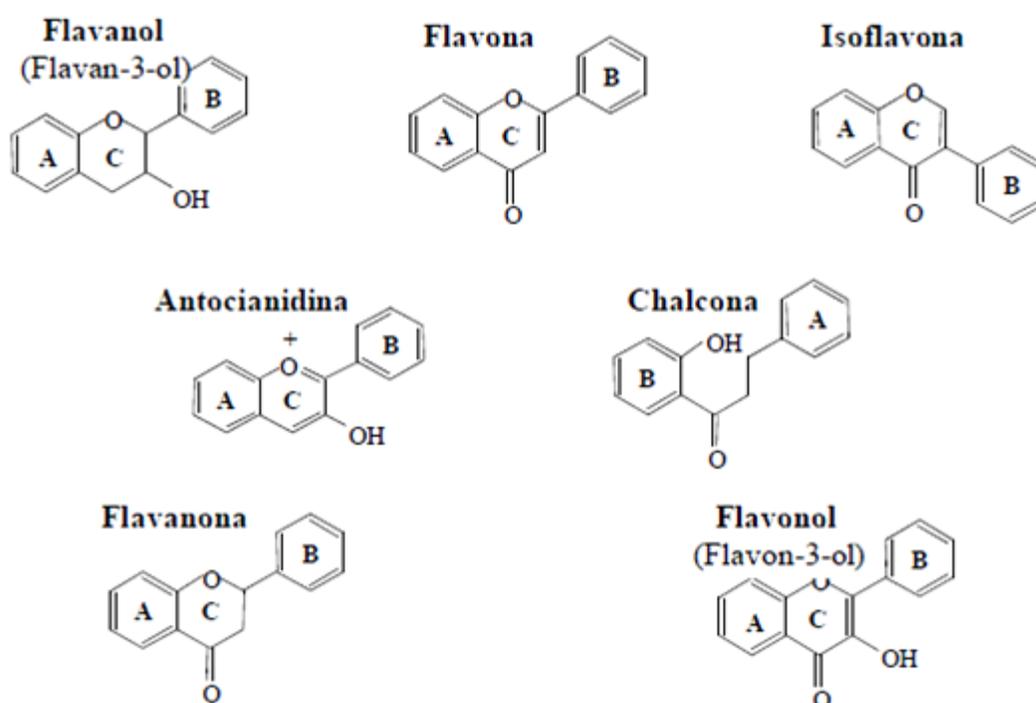


Figura 6. Clasificación de flavonoides [60] [61].

❖ **Cumarinas:** Estructuralmente son lactonas aromáticas [62], derivadas de la lactona del ácido O-hidroxi-cinámico [54] [61]. Se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas, presentándose a menudo como mezclas, en forma libre o como glicósidos [63], la estructura de la cumarina consiste en un anillo aromático unido a un anillo de lactona condensado [64], más concretamente son Benzo- α -pironas (C₆C₃) [65] [66], la estructura básica se muestra en la figura 7 [67].

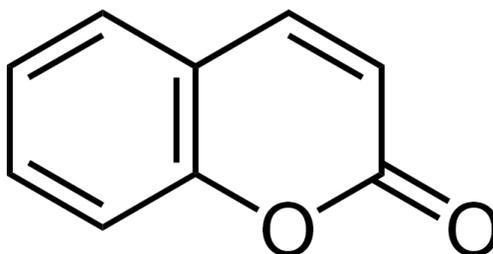


Figura 7. Estructura básica de las cumarinas [67].

Se ha reportado que estos compuestos exponen propiedades antioxidantes, analgésicas, antiinflamatorias, antimutagénicas [64], antitrombótico, antimicrobiano, antiviral [59].

❖ **Terpenos:** Son hidrocarburos complejos de bajo peso molecular, están ampliamente distribuidos en el reino vegetal [61]. La mayoría de las plantas los acumulan en sus tejidos o los liberan en el ambiente [68], su frecuencia y abundancia está íntimamente ligada a factores genéticos y climáticos de la planta, es decir los terpenos constituyen un sistema defensivo crucial para la supervivencia de las especies vegetales [69] [68], pueden encontrarse solos o formando glicósidos.

La unidad fundamental que define estas estructuras contiene cinco átomos de carbono y se la conoce como isopreno (Figura 8) [69]. Los terpenos se clasifican según el número de dímeros de isopreno que forman su estructura.

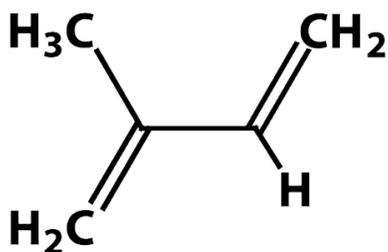


Figura 8. Estructura del isopreno [70].

❖ **Esteroides cardiotónicos:** Se encuentran principalmente en las hojas de algunas plantas; los cardiotónicos son sustancias constituidas de una porción esteroide, una porción glicosídica y un anillo de γ -lactona α,β -insaturada o δ -lactona- α,β -insaturada, que actúan sobre el músculo cardíaco y por tanto se utilizan como medicamentos contra la insuficiencia cardíaca. La figura 9 muestra la estructura estereoquímica general de los cardiotónicos [71] [72].

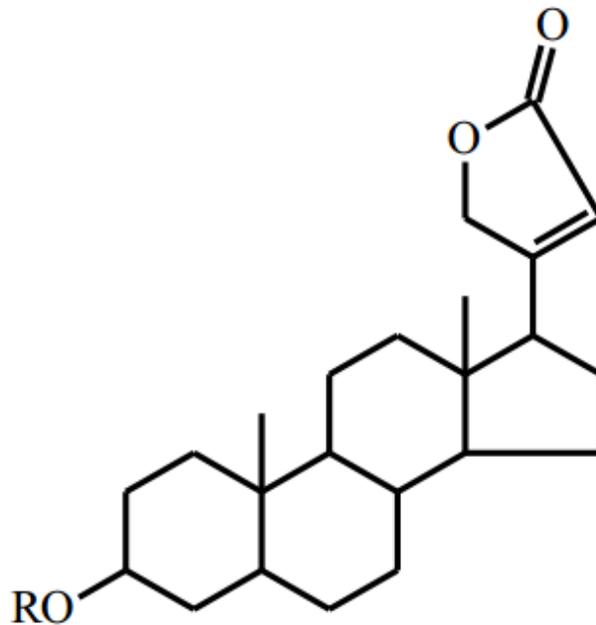


Figura 9. Estructura general de cardiotónicos [71].

6. MARCO METODOLÓGICO

Esta investigación está enfocada en generar información acerca de la actividad biológica del extracto de *Pavonia sepioides*, una planta medicinal utilizada en la región andina colombiana. La evaluación del efecto citotóxico y genotóxico del extracto sobre linfocitos humanos cultivados *in vitro*, se realizó en el Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, mediante investigación experimental con diseño de bloques aleatorizados.

6.1 ENCUESTA ETNOBOTÁNICA SOBRE *Pavonia sepioides*.

Para determinar si las personas conocen las propiedades medicinales de la planta se realizó entrevistas a 60 habitantes de la zona rural de dos municipios del Cauca: El Tambo y Argelia.

La definición de la muestra de personas entrevistadas, no fue al azar, por lo que se hizo un muestreo no probabilístico, intencional con informantes estratégicos y con disposición a colaborar. En total se hicieron 60 encuestas por medio de un cuestionario (Ficha etnobotánica) (Anexo 1).

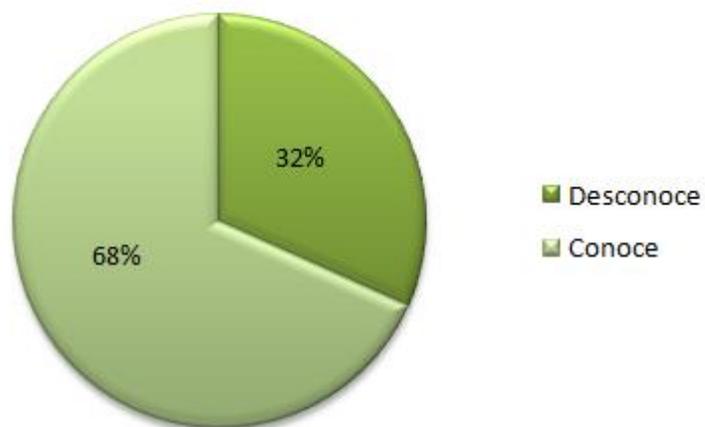


Figura 10. Porcentaje de personas encuestadas que conocen y desconocen los usos medicinales de *Pavonia sepioides*.

6.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

La identificación botánica del ejemplar recolectado en la ciudad de Popayán fue realizada por el Doctor Bernardo Ramírez, Director del Herbario de la Universidad del Cauca, ubicado en el Museo de Historia Natural.

Sitio de recolección: Popayán, vereda Belén, 1850 msnm.

Código de referencia en el herbario: 01 (CAUP).

Se recolecta 1 Kg de hojas de la planta, que posteriormente se seca y macera; se procede a extraer los analitos de la planta por medio del método de extracción Soxhlet [48]. El extracto etanólico obtenido, se rota-evapora con fin de eliminar la mayor parte del disolvente (etanol). Una vez extraídos los analitos, el extracto se diluye en agua y se esteriliza (filtración) en cámara de flujo laminar.

Para encontrar la concentración de la solución, se toma 1mL del extracto y se seca a 39°C, determinando así la cantidad de solutos presentes en la muestra (concentración en mg/mL). Más adelante se realiza una dilución seriada del extracto (factor de dilución $\frac{1}{2}$), con el fin de preparar las soluciones de trabajo (Tabla 1).

El extracto total de la planta se conservó, protegido de la luz, aire y humedad, refrigerado a 4° C, pues la temperatura baja reduce la degradación de los productos naturales bioactivos [12].

Tabla 1. Concentración de las soluciones de trabajo del extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* empleadas para elegir las concentraciones alta, media y baja utilizadas en la prueba de citotoxicidad y genotoxicidad.

CONCENTRACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO (mg/mL)	CONCETRACION FINAL EN EL MEDIO (mg/mL)*
2,63	0,105
1,32	0,053
0,66	0,026
0,33	0,013
0,16	0,006
0,08	0,003
0,04	0,002
0,02	0,001

*0,2mL de la solución de trabajo se agrega a cada cultivo de 5mL.

6.3 CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS DE SANGRE PERIFÉRICA

6.3.1 Obtención de la muestra de sangre. La muestra de sangre periférica se extrae de un donante sano, que no esté expuesto a fármacos quimioterapéuticos, drogas psicoactivas, cigarrillo y que no presente antecedentes de enfermedades como cáncer, puesto que los resultados podrían verse influenciados.

Cada muestra de sangre necesaria para esta investigación, se extrajo en jeringas estériles de 5mL con 0,2mL de Heparina (Ivenex # 33-10); estas fueron tomadas con normas de bioseguridad, por personal capacitado [44].

6.3.2 Siembra de linfocitos humanos. En tubos de cultivo estériles de 15mL, se adicionan 4,5mL de medio RPMI 1690 (Sigma, R-8758) suplementado con penicilina-estreptomina (Sigma, A-5955) (1%), suero bovino fetal (Sigma, F-2442) (10%) y L-glutamina (Sigma, G-7513) (1%). Posteriormente se adicionan 8 gotas de sangre (0,5mL) y finalmente se agrega Fitohemaglutinina (Sigma, L-8754) (2%). Los cultivos se incuban a 37°C, durante 72h [44].

6.3.3 Tratamiento de los cultivos. A las 48 horas de iniciada la siembra se aplican los cinco tratamientos, agregando 0,2 mL de cada concentración del extracto (0,66mg/mL, 1,32mg/mL, 2,63 mg/mL), 0,2 mL agua estéril y 0,2 mL MMC a los cultivos correspondientes. Se continúa con el proceso de incubación.

6.3.4 Cosecha de linfocitos humanos. A las 70 horas de iniciada la siembra se agrega 0,1 ml de Colcemid (Sigma, C-9754) (10µg/mL) a cada cultivo; terminadas las 72 horas de incubación, los cultivos se centrifugan a 1200 rpm durante 7 minutos y se descarta el sobrenadante. Se adicionan 6mL de solución Hipotónica de cloruro de potasio (0,075M), y se incuba a 37°C por 28 minutos. Se realiza una prefijación agregando 2 ml de Carnoy (Ácido acético y metanol 1:3) y se centrifuga por 7 minutos a 1200 rpm. Se descarta el sobrenadante y se adicionan 5mL de fijador Carnoy (frio), se refrigera por 20 minutos y el procedimiento de fijación se repite 2 veces más (sin refrigeración) [44].

6.3.5 Preparación de los extendidos celulares. Tomando una placa fría y humedecida con ácido acético al 60%, se dejan caer 8 gotas de la suspensión celular concentrada, en diferentes lugares de la placa, usando una pipeta Pasteur. Posteriormente se colocan las placas en un plato caliente a 45°C, para mejorar el extendido celular [44].

6.3.6 Coloración directa con giemsa. La coloración se realiza con giemsa al 10%; esta se prepara con 6mL de colorante y 54mL de agua, que son filtrados y vertidos en un coplin. Se ubica una placa en posición vertical dentro del coplin por 5 minutos. Esta operación se repite para ajustar el tiempo de coloración hasta que sea la correcta [44].

6.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

6.4.1 Análisis previo de índice Mitótico para elegir las concentraciones alta, media y baja del extracto. Mediante la prueba de IM para las ocho concentraciones del extracto (tabla 1), se identifican las concentraciones alta, media y baja necesarias para realizar el análisis de citotoxicidad y genotóxicidad.

6.4.2 Prueba de citotóxicidad. Se emplea el biomarcador Índice Mitótico, para determinar las alteraciones generadas por el extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* en el ciclo normal de división celular de linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*.

A las 48h después de la siembra, se adicionan las soluciones de trabajo del extracto de *Pavonia sepioides* (concentración baja, media, alta), a razón de 0,2mL por cultivo, de tal manera que la concentración final en el medio este con un factor de dilución 2/50 (0,2mL/5mL). Se incluye un control negativo tratado con 0,2mL de agua estéril y un control positivo tratado con 0,2 mL de MMC (0,025 mg/mL), posteriormente se agrega el Colcemid a las 70h y se cosecha a las 72h.

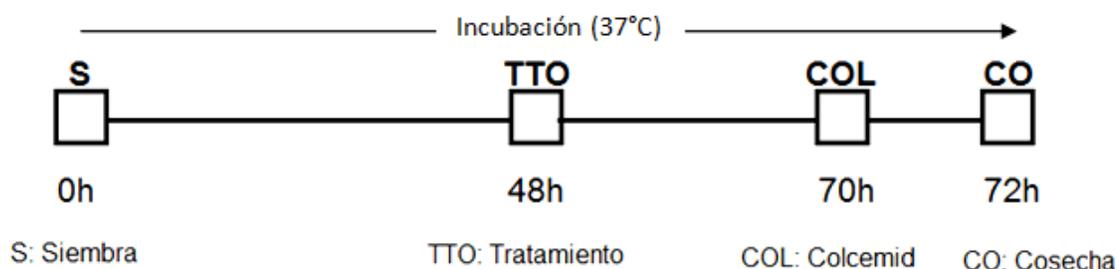


Figura 11. Protocolo experimental para la prueba de citotoxicidad.

6.4.3 Prueba de genotoxicidad. Para identificar el efecto del extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* sobre el material genético, en esta investigación se utiliza como biomarcador de genotoxicidad la prueba de alteraciones cromosómicas.

El tratamiento se aplica a las 48h después de realizada la siembra, adicionando a cada cultivo 0,2mL de las soluciones de trabajo respectivas: concentración baja (0,66mg/mL), media (1,32mg/mL) y alta (2,63 mg/mL) del extracto de *Pavonia sepioides*; se incluye el control negativo tratado con 0,2mL de agua estéril y el control positivo tratado con 0,2mL de Mitomicina C (0,25mg/mL), posteriormente se agrega el Colcemid a las 70h y se cosecha a las 72h.

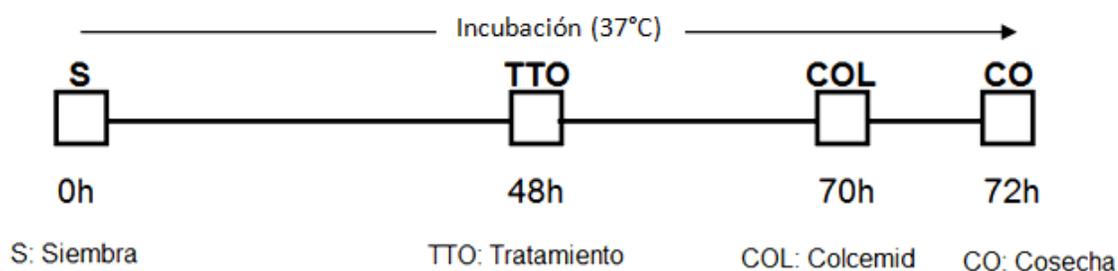


Figura 12. Protocolo experimental para la prueba de genotoxicidad.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

6.5.1 Tipo de estudio. Este estudio es de tipo experimental, *in vitro*, cuya finalidad es identificar la relación causal o de dependencia entre la exposición de linfocitos humanos al extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* y la citotoxicidad (IM) y genotoxicidad (AC) generadas. En esta investigación se aplica un diseño de bloques completos aleatorizados. El bloque es cada uno de los tres experimentos que se hicieron en tres semanas diferentes. Dentro de cada experimento (bloque), se aplicaron los tratamientos por duplicado.

Para evitar la variabilidad en los resultados, en esta investigación se seleccionó un donante sano de 22 años de edad, y su sangre fue empleada en todos los experimentos de la investigación.

6.5.2 Variables:

Tabla 2. Identificación de las variables de la investigación.

VARIABLE	TIPO		
	FORMA DE REGISTRO	ESCALA DE MEDIDA	RELACION EN EL PROBLEMA
Tratamientos (control negativo, concentraciones del extracto, control positivo)	Cualitativa	Ordinal	Independiente
Índice mitótico (IM)	Cuantitativa	Continua	Dependiente
Alteraciones Cromosómicas (AC)	Cuantitativa	Discreta	Dependiente

6.5.3 Prueba de citotoxicidad (IM). Cada experimento (bloque) comprendió cinco (5) tratamientos: tres concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* (alta, media y baja), un control negativo (Agua estéril) y un control positivo (Mitomicina C). Cada tratamiento se evaluó por duplicado, para un total de 10 cultivos por experimento, es decir 30 cultivos en tres repeticiones del experimento, con lo cual se registraron 6 datos, por cada tratamiento.

En cada cultivo o réplica del tratamiento, se analizaron 1000 células y el índice mitótico se registró como:

$$IM (\%) = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células en metafase}}{1000 \text{ células}} \times 100$$

6.5.4 Prueba de genotoxicidad (AC). Cada experimento comprendió cinco (5) tratamientos: un control negativo (Agua estéril), tres concentraciones del extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* y un control positivo (Mitomicina C), cada uno por duplicado, para un total de 10 cultivos por experimento, es decir 30 cultivos en tres repeticiones del experimento. En total se registraron 6 datos por tratamiento.

En cada cultivo o réplica del tratamiento se analizaron 100 células en metafase y se registró la frecuencia de alteraciones cromosómicas (AC), como el número de AC en 100 células (N° de AC/100 células).

6.5.5 Pruebas estadísticas. En esta investigación los datos obtenidos de la prueba de índice mitótico y alteraciones cromosómicas fueron tabulados y analizados mediante el programa SPSS15.0. Se realizó un análisis preliminar, que incluyó estadística descriptiva y prueba de bondad de ajuste a la curva normal (test de Shapiro Wilk). Como los datos de IM/AC no se ajustaron a la distribución normal (S-W: $P < 0.05$), se empleó la prueba de Kruskal Wallis para la comparación global de los tratamientos, complementada con la prueba U de Mann Whitney para compararlos por parejas.

Además se realizó análisis de asociación entre las concentraciones del extracto y cada uno de los biomarcadores (IM, AC); con el fin de identificar la fórmula de regresión que relaciona dichas variables.

7. RESULTADOS

7.1 ANÁLISIS PREVIO DE ÍNDICE MITÓTICO PARA ELEGIR LAS CONCENTRACIONES ALTA, MEDIA Y BAJA DEL EXTRACTO DE *Pavonia sepioides*

Mediante el análisis del Índice Mitótico de diez tratamientos: ocho concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides*, un control negativo (Agua estéril) y un control positivo (MMC 0,025 mg/mL); se identificó las concentraciones de trabajo (Alta, Media y Baja) empleadas en la prueba de citotoxicidad y genotóxicidad. En la tabla 3 se muestran los resultados del Índice Mitótico registrado como Promedio \pm Error Estándar, calculado con base en dos replicas por tratamiento.

La figura 13 muestra la asociación negativa ($R = -0,869$), significativa estadísticamente ($P = 0,0001$), entre las concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* y el porcentaje de Índice mitótico.

A partir de las concentraciones de las ocho (8) concentraciones del extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* evaluadas mediante la prueba de Índice Mitótico, se identificaron las tres concentraciones del extracto necesarias para realizar la prueba de Citotoxicidad y Genotóxicidad. Estas concentraciones fueron: 0,66mg/mL como concentración baja; 1,32mg/mL como concentración media y 2,63mg/mL como concentración alta; ya que redujeron el índice mitótico a un 75-80%, 50-60% y 30-40% respectivamente, en comparación al control negativo (Tabla 3).

Tabla 3. Promedio de Índice Mitótico obtenido al tratar los linfocitos humanos cultivados *in vitro* con ocho concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides*, un control negativo (Agua Estéril) y un control positivo (MMC).

Tratamientos	Promedio de IM (%) ± Error estándar
Control Negativo	
Agua estéril	5,95 ± 0,200
Concentraciones del extracto (<i>P. sepioides</i>)mg/mL	
0,02	5,50 ± 0,300
0,04	5,20 ± 0,300
0,08	4,88 ± 0,575
0,16	5,33 ± 0,375
0,33	4,68 ± 0,325
0,66	4,55 ± 0,250
1,32	3,38 ± 0,275
2,63	2,63 ± 0,025
Control Positivo (MMC)	
0,025 mg/mL	2,05 ± 0,250
P = 0,006	

MMC: Mitomicina C; **IM (%)**: Porcentaje del Índice mitótico.

P: nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Porcentaje de Índice Mitótico

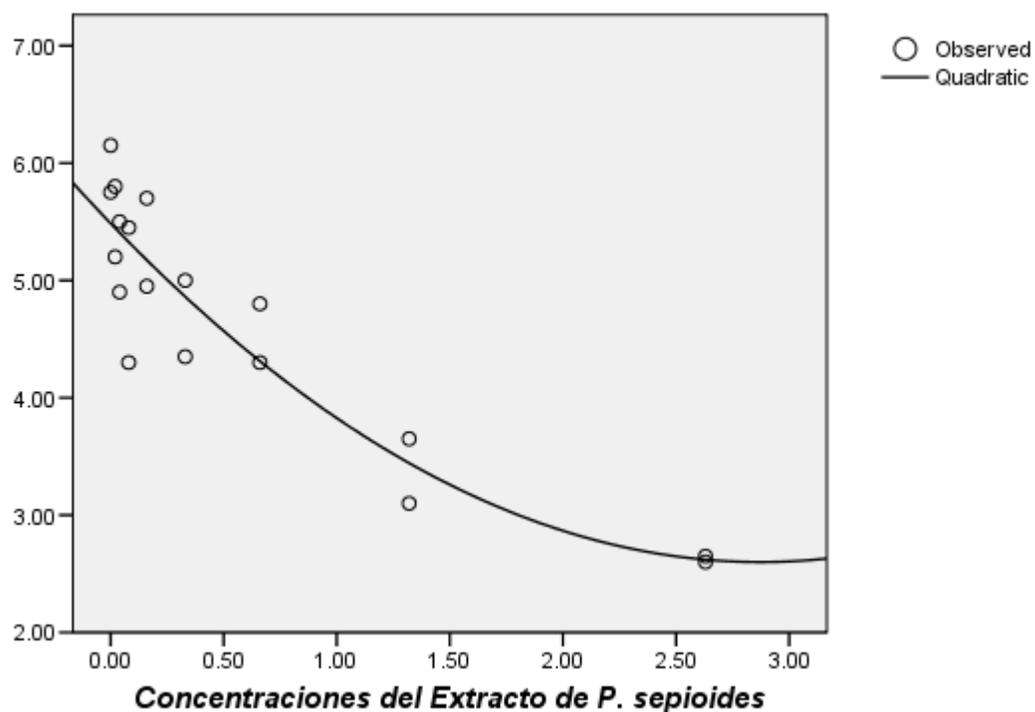


Figura 13. Curva de mejor ajuste que explica la asociación entre las concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* y el Índice mitótico, en linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

7.2 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD

El extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* presentó actividad citotóxica en linfocitos humanos cultivados *in vitro*. En la tabla 4 se muestra el índice Mitótico promedio \pm Error Estándar, calculado con base a los 6 datos registrados en 3 repeticiones del experimento; cada experimento consistió en cinco tratamientos: tres concentraciones del extracto (baja, media, alta), un control negativo (agua estéril), y un control positivo (MMC).

Tabla 4. Promedio de Índice mitótico obtenido al tratar los linfocitos humanos de sangre periférica, cultivados *in vitro* con tres concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides*, un control negativo (Agua Estéril) y un control positivo (MMC).

Tratamientos	Promedio de IM (%) ± Error Estándar
Control Negativo	
Agua estéril	5,16 ± 0,385
Concentraciones del extracto (<i>P. sepioides</i>)	
Baja (0,66 mg/mL)	4,23 ± 0,174
Media (1,32 mg/mL)	3,80 ± 0,311*
Alta (2,63 mg/mL)	3,50 ± 0,344*
Control Positivo (MMC)	
0,025 mg/mL	1,83 ± 0,516*
P = 0,001	

MMC: Mitomicina C; **IM (%):** Porcentaje del Índice mitótico.

P: nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

* Tratamientos que difieren significativamente respecto al Control Negativo, determinado mediante la prueba de comparaciones por parejas U de Mann-Whitney.

Con los datos obtenidos en la prueba de citotoxicidad, se realizó una comparación global de los cinco tratamientos (control negativo (Agua Estéril), control positivo (MMC) y tres concentraciones del extracto de *P. sepioides*) mediante la prueba de Kruskal Wallis, identificando diferencia significativa estadísticamente (P 0,001) entre los Índices Mitóticos (%) de los cinco tratamientos. Mediante la prueba de comparación por parejas U de Mann Whitney, se identificaron los tratamientos que difieren significativamente del control negativo. El índice mitótico promedio correspondiente a la concentración baja (0,66 mg/mL) no difiere del control

negativo (agua estéril). El índice mitótico promedio de las concentraciones media (1,32 mg/mL) y alta (2,63 mg/mL), difieren significativamente del control negativo (agua estéril), confirmando su efecto citotóxico dependiente de la dosis. Sin embargo, la citotoxicidad no es tan alta como la registrada en el control positivo.

Para identificar la relación dosis-respuesta entre las concentraciones del extracto de *Pavonia. sepioides* y los porcentajes de Índice Mitótico, se realizó la prueba de correlación de Spearman y se identificó una asociación negativa ($R = -0,653$) estadísticamente significativa ($P = 0,001$) entre el Índice Mitótico y las concentraciones del extracto, es decir, que el incremento en las concentraciones del extracto de *P. sepioides* disminuye el Índice Mitótico en forma significativa ($P = 0,001$).

En la figura 14 se muestra la curva de mejor ajuste, significativa estadísticamente ($P = 0,002$), que describe una asociación cuadrática entre las concentraciones del extracto y el IM (%).

La relación de tipo cuadrática está dada por la siguiente ecuación: $IM (\%) = 5,132 - 1,485 * [\text{extracto mg/mL}] + 0,33 * [\text{extracto mg/mL}]^2$. El coeficiente de determinación $R^2 = 0,441$, permite inferir que la variabilidad observada en el Índice Mitótico (%) depende en un 44,1 % de la variación en las concentraciones del extracto.

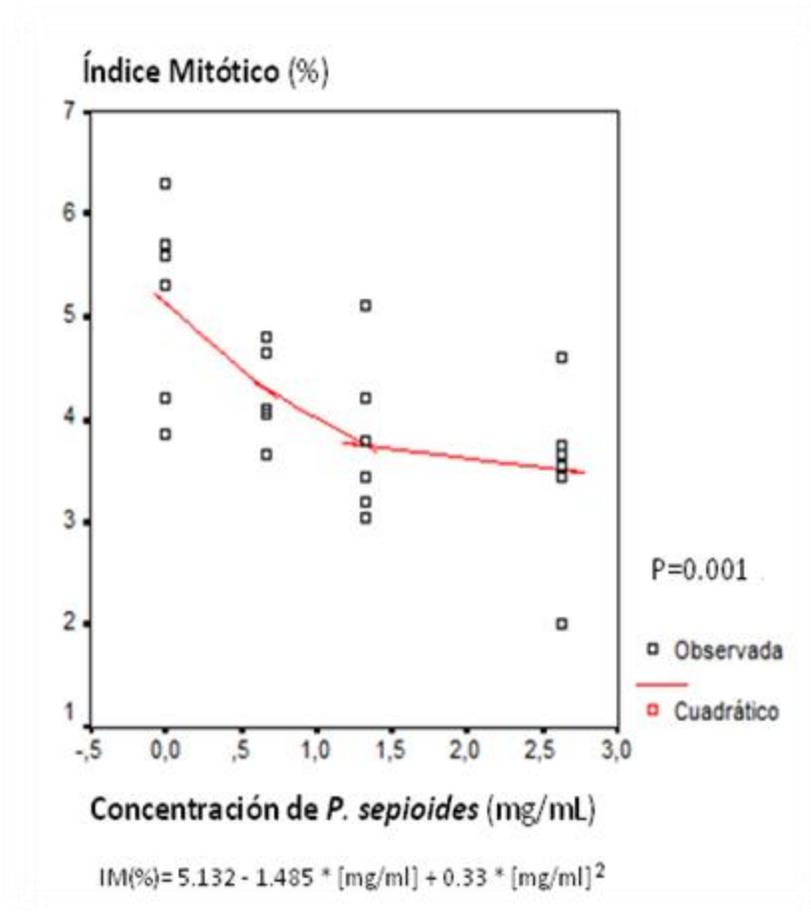


Figura 14. Curva de mejor ajuste que explica la asociación entre las concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* y el Índice mitótico, en linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

7.3 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD

El extracto etanólico total de *Pavonia sepioides*, presentó actividad genotóxica en linfocitos humanos cultivados *in vitro* (figura 17 y 18). En la tabla 5 se muestra el número promedio \pm error estándar de alteraciones cromosómicas (Roturas Cromosómicas, Roturas Cromatídicas y Alteraciones Totales), calculado con base a 6 datos por tratamiento registrados en 3 repeticiones del experimento; cada experimento incluyó cinco tratamientos: tres concentraciones del extracto, control

negativo (Agua Estéril), control positivo (MMC). En cada experimento, los tratamientos se evaluaron con réplica.

Con los datos obtenidos en la prueba de Genotóxicidad, se realizó una comparación global de los cinco tratamientos: control negativo (Agua Estéril), control positivo (MMC) y tres concentraciones del extracto de *P. sepioides*. Mediante la prueba de Kruskal Wallis se identificó diferencia significativa estadísticamente entre los promedios de alteraciones cromosómicas de los tratamientos (Tabla 5).

Mediante la prueba de comparación por parejas “U de Mann Whitney”, se identifica a los tratamientos que difieren significativamente respecto del control negativo; estos son: (i) la concentración media del extracto (1,32 mg/mL) que incrementó la frecuencia de quiebres tipo cromatídico y el total de AC/100 células; (ii) la concentración alta del extracto (2,63 mg/mL) que incrementó significativamente el número total de AC, y (iii) el control positivo (MMC 0,025 mg/mL), que incrementó significativamente el número de rupturas cromatídicas, el número de rupturas cromosómicas y el total de AC (Tabla 5).

Además, es conveniente resaltar; que el incremento significativo del daño cromosómico, respecto al control negativo, no es igual para todos los tratamientos, así:

Para la concentración media del extracto (1,32 mg/mL), la frecuencia de rupturas cromatídicas es mayor que las rupturas cromosómicas y son las más influyentes en el resultado de AC_{totales}/100 células.

En la concentración alta (2,63 mg/mL) la frecuencia de rupturas cromosómicas es mayor a la frecuencia de rupturas cromatídicas, pero por si solas no son significativas respecto al control negativo, sin embargo, su suma (AC_{totales}/100

células) sí alcanza un promedio que es significativamente mayor que el reportado en el control negativo.

El control positivo es un buen inductor de rupturas cromatídicas y cromosómicas, por lo tanto sus promedios y su suma (AC_{totales}/100 células) difieren significativamente del registrado en el control negativo.

Para identificar la relación dosis-respuesta entre las concentraciones del extracto y el promedio de alteraciones cromosómicas totales, se realizó la prueba de correlación de Spearman. Se identificó asociación positiva ($R= 0,659$), significativa estadísticamente ($P= 0,0001$), entre los promedios de alteraciones cromosómicas totales y las concentraciones del extracto de *P. sepioides*.

Mediante análisis de curva de mejor ajuste, se identificó una asociación cuadrática positiva significativa estadísticamente ($P= 0,015$), que describe la relación entre las concentraciones del extracto y las alteraciones cromosómicas totales (figura 15).

Tabla 5. Número promedio de Alteraciones Cromosómicas/100 células, obtenido al tratar los linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*, con tres concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides*, un control negativo (Agua Estéril) y un control positivo (MMC).

Tratamientos	N° promedio de alteraciones cromosómicas/100 células ± Error estándar**		
	Roturas Cromatídicas	Roturas Cromosómicas	Total AC/100 células
	Control Negativo		
Agua estéril	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000	0,00 ± 0,000
Concentraciones del extracto (<i>P. sepioides</i>)			
Baja (0,66 mg/mL)	0,00 ± 0,000	1,00 ± 0,683	1,00 ± 0,683
Media (1,32 mg/mL)	1,33 ± 0,211*	0,67 ± 0,422	1,83 ± 0,477*
Alta (2,63 mg/mL)	0,67 ± 0,333	1,67 ± 0,803	2,33 ± 0,760*
Control Positivo (MMC)			
0,025 mg/mL	3,00 ± 0,447*	2,83 ± 0,749*	5,83 ± 0,872*
	P = 0,0001	P = 0,045	P = 0,001

MMC: Mitomicina C; **AC:** Alteraciones cromosómicas/100 células.

P: nivel de significancia calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

*: Tratamientos que difieren significativamente respecto al Control Negativo, determinado mediante la prueba de comparaciones por parejas U de Mann-Whitney.

**.: Promedio del resultado de seis datos por tratamiento.

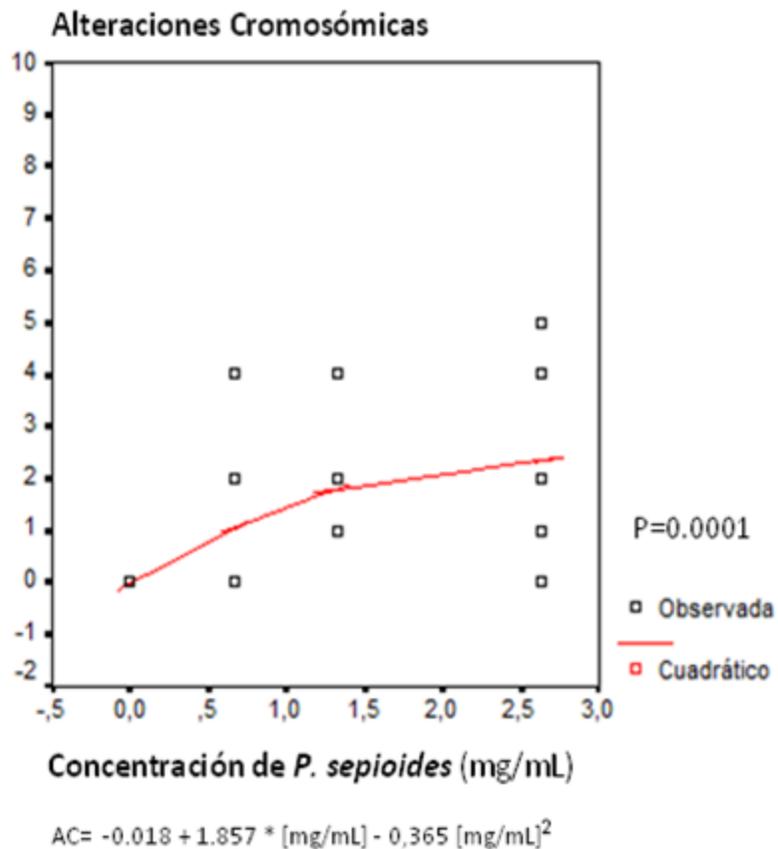


Figura 15. Curva de mejor ajuste que explica la asociación entre las concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* y las alteraciones cromosómicas totales, en linfocitos humanos de sangre periférica cultivados *in vitro*.

La relación de tipo cuadrática está dada por la siguiente ecuación: $AC \text{ totales} = -0,018 + 1,857 * [\text{extracto mg/mL}] - 0,365 * [\text{extracto mg/mL}]^2$. El coeficiente de determinación $R^2=0,329$ permite inferir que la variabilidad observada entre los promedios de alteraciones cromosómicas totales, depende en un 32,9 % de la variación en las concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides*.

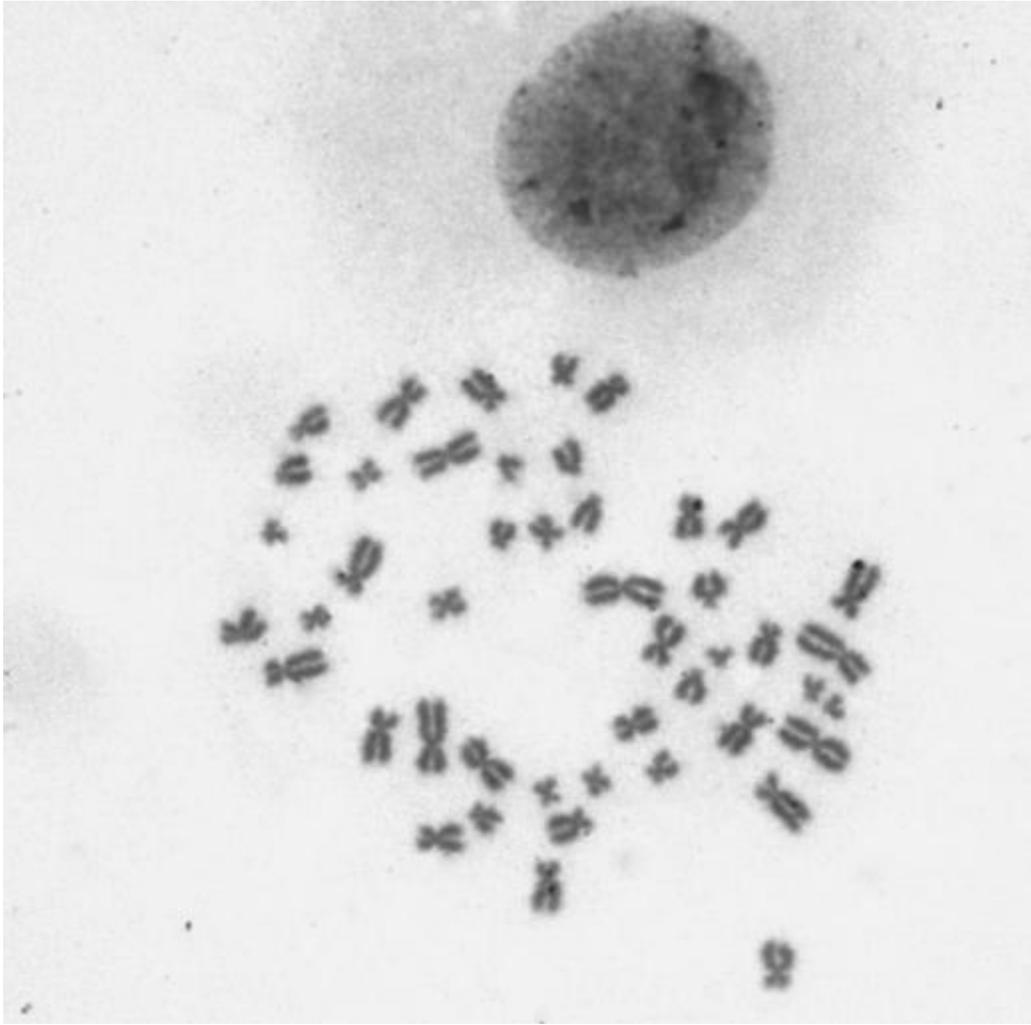


Figura 16. Imagen de metafase normal, Microscopio Nikon (100X).

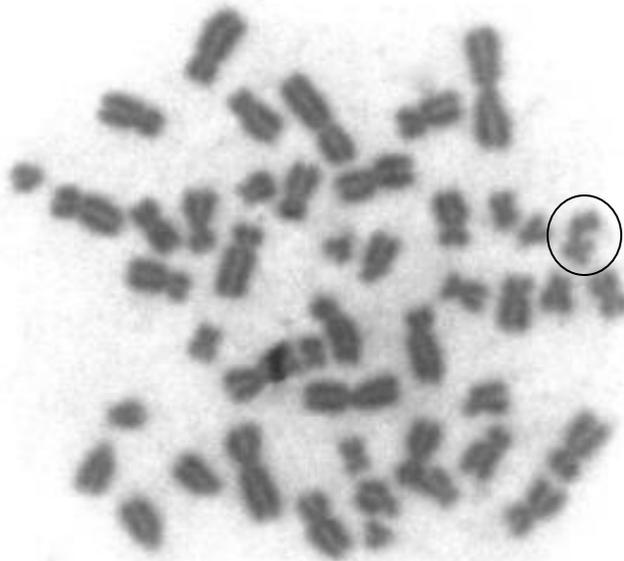


Figura 17. Imágenes de rupturas cromatídicas, Microscopio Nikon (100X).

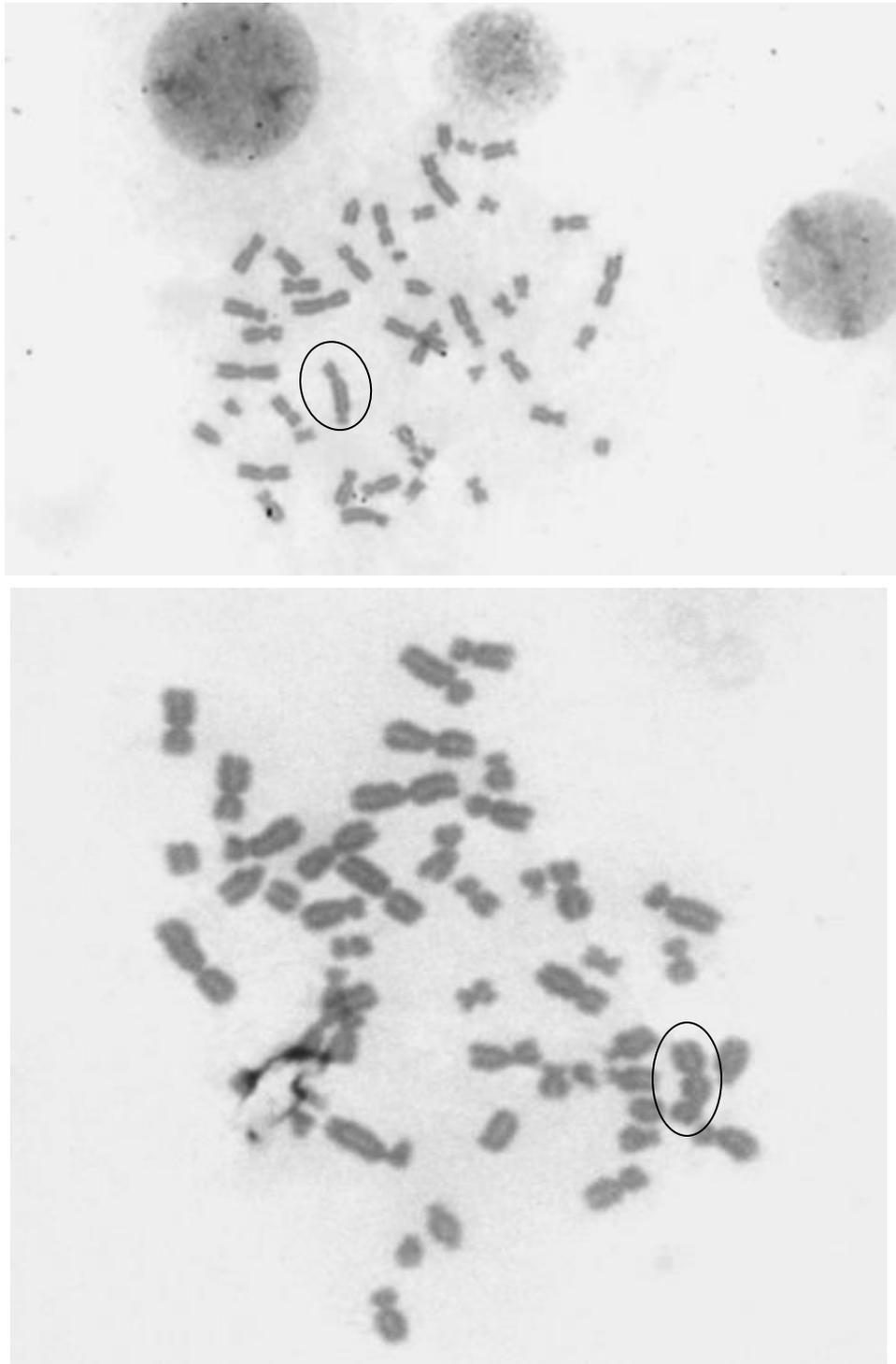


Figura 18. Imágenes de cromosomas dicéntricos (rupturas cromosómicas), Microscopio Nikon (100X).

8. DISCUSIÓN

El crecimiento continuo de la exposición humana a los productos naturales empleados en la medicina tradicional ha llevado a un resurgimiento del interés científico por sus efectos biológicos [73]. Por tanto, el estudio de las propiedades tóxicas, genotóxicas, mutagénicas y/o carcinogénicas, de compuestos de fuentes naturales, constituye un requisito imprescindible para que estos compuestos puedan ser reconocidos como productos consumibles por el ser humano [74] [75].

La toxicidad de las plantas medicinales está relacionada con la mezcla de componentes activos presentes en todas sus partes (tallo, hojas, flores, frutos, raíz), las cuales pueden ser mezclas complejas de alcaloides, terpenos, saponinas, cumarinas, flavonoides y otros compuestos químicos, de los cuales se ha reportado que incrementan el riesgo de reacciones adversas, actuando de forma individual, aditiva o sinérgica [76] [77] y teniendo en cuenta que la toxicidad de estas plantas aumenta a causa del efecto fisiológico de dichos compuestos y de un prolongado tiempo de uso; es necesaria la evaluación de perfiles de eficacia y seguridad de las plantas medicinales mediante pruebas bien establecidas como por ejemplo, pruebas a corto plazo para la evaluación de genotoxicidad y citotoxicidad que suelen utilizarse para identificar posibles mutágenos y carcinógenos así como también sustancias con propiedades citoprotectoras y antigenotóxicas [73]. Este es el caso de las pruebas de Índice Mitótico y Alteraciones Cromosómicas realizadas en esta investigación.

8.1 PRUEBA DE CITOTOXICIDAD

La interacción de las diferentes estructuras químicas presentes en extractos vegetales con las moléculas celulares, interfieren en el desarrollo normal del ciclo celular, causando alteraciones celulares [4].

El extracto etanólico total de *Pavonia sepioides* presentó actividad citotóxica en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, que se reflejó en un efecto mitodepresivo encontrado en los cultivos tratados con las tres concentraciones del extracto: 0,66 mg/mL, 1,32 mg/mL y 2,63 mg/mL (Ver tabla 4), haciéndose evidente una relación negativa entre las concentraciones del extracto y el índice mitótico (Ver figura 14).

Estos resultados se deben a que el extracto total de la planta en estudio, posee una mezcla compleja de compuestos que alteran las condiciones normales del cultivo celular, haciendo posiblemente que los linfocitos pierdan la capacidad de responder al estímulo mitogénico y/o que la proliferación celular se vea afectada. Entonces se sugiere que los fitocomponentes presentes en el extracto de *Pavonia sepioides* posiblemente ejercen su acción sobre las fases previas a la mitosis (G1, S, G2), desencadenando así procesos que inhiben o retrasan la cinética de proliferación celular o conllevan a la muerte de la célula. Este comportamiento se puede atribuir a la presencia de flavonoides, cumarinas [52], terpenos [78] [79] y esteroides [80], de los cuales se ha reportado notoria actividad citotóxica en ensayos *in vivo* e *in vitro*.

Se ha encontrado que los flavonoides exhiben efecto antiproliferativo marcado; posiblemente inhibiendo enzimas que intervienen en el ciclo celular; se ha reportado, por ejemplo, que los flavonoides están involucrados en la inhibición o activación de las fosfatasa que regulan las cascadas de señalización y proteínas del ciclo celular [81]. Además, los flavonoides presentan efectos inhibitorios sorprendentes sobre la liberación de citoquinas, lo que lleva a considerar la posibilidad de mecanismos citotóxicos y pro-apoptóticos, dado que el aumento en la liberación de citoquinas es parcialmente dependiente de una respuesta proliferativa fuerte [58]. Se ha encontrado también evidencia de que los flavonoides Kaemferol y Quercetin inducen apoptosis por que liberan citocromo c, procaspasa-9, promoviendo la liberación de la caspasa-3 [82].

Se ha demostrado también que las cumarinas tienen efecto citotóxico. En 1987, Conley y Marshall evaluaron *in vitro* la toxicidad de la cumarina utilizando líneas celulares: renal (ACHN y Caki-2) y eritroleucémica (K562), reportando que la cumarina induce a que un gran porcentaje de células se acumulen en fase G₀, G₁ del ciclo celular, haciendo que un menor número de células entren en la fase S, indicando la naturaleza citostática de la cumarina [83], Se sabe también que la cumarina puede causar toxicidad en el hígado de varias especies, y es considerada un carcinógeno no genotóxico en roedores [84]. Felter et al, 2006, reporta que dosis altas de cumarina evaluadas en roedores, posee citotoxicidad e hiperplasia regenerativa causando toxicidad hepática [85].

Conjuntamente, se conoce que los terpenos también presentan actividad citotóxica en algunos tipos celulares. Mendanha et al, 2013, demostró que los terpenos poseen efecto citotóxico en células fibroblásticas puesto que causan daño celular y sugiere que los terpenos podrían desencadenar diversos mecanismos, incluyendo interacciones con la membrana celular, alterando la red de enlaces de hidrógeno de la bicapa lipídica y debilitando de la membrana, lo que puede implicar que los terpenos facilitan la entrada de otras moléculas a la célula; se les considera como potenciadores químicos de permeabilidad, aumentando la fluidez de la membrana celular en eritrocitos y fibroblastos [86], y debido a las características citotóxicas que han exhibido estos compuestos, se han utilizado como agentes antitumorales [87] [88], y están implicados en los mecanismos de acción y los efectos farmacológicos de muchas plantas medicinales utilizadas en la medicina popular [78]

Además se ha reportado que Los glicósidos cardiotónicos tienen acción citotóxica inhibiendo la bomba Na⁺/K⁺ATPasa, ocasionando un aumento de Ca²⁺ intracelular, pues tienen la capacidad de unirse a esta importante proteína de transporte de iones, por lo tanto alteran las condiciones normales de la célula, lo que puede desencadenar procesos de muerte celular [80] [72].

Son entonces los flavonoides, cumarinas, terpenos y cardiotónicos los metabolitos que se encuentran probablemente más involucrados en la actividad citotóxica que presentó el extracto etanólico total de *Pavonia sepioides*.

8.2 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD

Estudios del potencial genotóxico de plantas empleadas en la medicina tradicional, permiten conocer cómo los daños en el material genético pueden conducir a mutaciones críticas y por lo tanto al aumento del riesgo de cáncer y otras enfermedades [73] [75].

Los efectos de las sustancias tóxicas pueden observarse a nivel de cromosomas (clastogénesis) en forma de alteraciones en la estructura del cromosoma (alteraciones cromosómicas) y en el número de cromosomas (aneuploidía, poliploidía) [39] [16]. Es por tal motivo que las alteraciones citogenéticas (alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas) en linfocitos de sangre periférica, han sido aplicados en la vigilancia de efectos tempranos de la carcinogénesis [73].

El extracto total de *Pavonia sepioides* presentó actividad genotóxica en los cultivos de linfocitos tratados con 1,32 mg/mL y 2,63 mg/mL del extracto (ver tabla 5), puesto que estas concentraciones incrementaron significativamente la frecuencia de alteraciones cromosómicas totales respecto al control (figura 16, 17 y 18); permitiendo observar un efecto dosis-respuesta de las concentraciones del extracto sobre el número de alteraciones cromosómicas totales, en linfocitos humanos (ver figura15).

Además, se identificó asociación positiva entre las concentraciones del extracto de *Pavonia sepioides* y las alteraciones cromosómicas totales, indicando que, al aumentar las concentraciones del extracto, aumentan las alteraciones

cromosómicas. Estos resultados pueden deberse a que el extracto tiene compuestos químicos que actúan como posibles clastógenos, formándose así las rupturas en los cromosomas metafásicos de linfocitos humanos.

Celik, 2012, sugiere que el aumento de alteraciones cromosómicas puede resultar de interacciones de una gran variedad de agentes químicos con el ADN [39]. Se sabe que un aumento en las alteraciones cromosómicas de linfocitos de sangre periférica está asociado con un aumento del riesgo de cáncer [8] [89].

En octubre del 2004, la European Food Safety Authority (EFSA, 2004), emitió un dictamen que indica que la cumarina no es genotóxica, pero Haworth et al., 1983, reportó que la cumarina es mutagénica en el test de Ames, sólo en una de cada cuatro cepas ensayadas de *Salmonella typhimurium* y en presencia de S9. Sin embargo, cuando se probó este compuesto en ensayos de intercambio de cromátides hermanas, utilizando ovario de hámster chino (CHO), se encontró que la cumarina aumenta el número de intercambios de cromátides hermanas (ICHs) a concentraciones bastante bajas, y sólo en ausencia de S9 [73].

Según Webb y Ebeler en el 2004, los flavonoides se consideran como veneno de la topoisomerasa, debido que estos compuestos inhiben la acción de esta enzima, la reparación de ADN podría verse afectada y esta acción tiene como resultado cambios cromosómicos, tales como los efectos clastogénicos [31], lo que puede explicar las rupturas observadas en esta investigación.

En esta investigación se aprecia que la actividad genotóxica está respaldada por la actividad citotóxica generada por el extracto de *Pavonia sepioides*; lo que concuerda con Galloway, 1998-2000, que sugiere que el daño de ADN solo se produce cuando hay efecto citotóxico; esto es, las células con un mayor daño cromosómico pueden morir antes de la división celular o pueden ser menos capaces de entrar en esta fase [39], por lo tanto, se observa una disminución en el

índice mitótico que a su vez evidencia un aumento en la cantidad de alteraciones cromosómicas.

Además de los resultados obtenidos en esta investigación, debe tenerse en cuenta la posibilidad de encontrar actividad antioxidante de esta planta debido a su contenido fenólico, como lo reporta Gasca & Cabezas, 2012, en la evaluación de la actividad antioxidante en el extracto etanólico del cadillo (*Pavonia sepioides*).

Nuestros resultados muestran que el extracto de *P. sepioides* tiene un potencial genotóxico in vitro a las concentraciones evaluadas, que exige una evaluación de seguridad más completa (incluyendo compuestos puros).

9. CONCLUSIONES

- ❖ El extracto total de *P. sepioides* tiene actividad citotóxica en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, puesto que el índice mitótico decrece al aumentar la concentración del extracto en los cultivos.
- ❖ El extracto total de *P. sepioides* tiene actividad genotóxica en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, porque el número de alteraciones cromosómicas es mayor al aumentar la concentración del extracto en los cultivos tratados.

Teniendo en cuenta los resultados de esta investigación se puede inferir que:

- ❖ El consumo de *P. sepioides*, puede generar riesgos a la salud de las personas que la consumen sin un control en su dosificación y tiempo de consumo.
- ❖ Considerando que la actividad identificada por este ensayo no confirma del todo la eficacia de una planta, pero si proporciona la comprensión básica de su toxicidad y pensando en medidas de regulación del consumo de esta planta medicinal, estudios de este tipo resultan favorables para prevenir riesgos potenciales de salud pública.

10.RECOMENDACIONES

- ❖ Se sugiere la realización de estudios más detallados sobre la toxicidad de la planta, que ayuden a evitar este potencial riesgo para la población que la consume.
- ❖ Se sugiere, además, trabajos de este tipo, con muestras más grandes y pruebas in vivo con organismos como *Mus musculus*, que permitan probar dosis similares a las utilizadas por la población Colombiana.
- ❖ Con el fin de tener mayor certeza acerca del efecto del extracto evaluado se considera pertinente aislar los principios activos de la planta, para confirmar la mutagenicidad y descubrir posibles fármacos de importancia en la medicina.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS, *Estrategia de la OMS sobre la medicina tradicional 2002-2005*. 2005.
2. Khader, M., N. Bresgen, and P.M. Eckl, *Antimutagenic effects of ethanolic extracts from selected Palestinian medicinal plants*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. **127**(2): p. 319-324.
3. OMS, *56ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD (Medicina Tradicional)*. 2003.
4. Barbosa, H.J. and D. Arias, *APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA "IN VITRO" PARA EVALUAR LA TOXICIDAD DE EXTRACTOS VEGETALES*. 1995.
5. Ramiro Fonnegra G, S.L.J.R., *Plantas Medicinales Aprobadas En Colombia* U.d. Antioquia, Editor. 2007: Antioquia.
6. Akinboro, A. and A. Bakare, *Cytotoxic and genotoxic effects of aqueous extracts of five medicinal plants on *Allium cepa* Linn.* Journal of Ethnopharmacology, 2007. **112**(3): p. 470-475.
7. Romero-Jiménez, M., et al., *Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2005. **585**(1): p. 147-155.
8. Siddique, Y.H., et al., *Antigenotoxic role of Centella asiatica L. extract against cyproterone acetate induced genotoxic damage in cultured human lymphocytes*. Toxicology in Vitro, 2008. **22**(1): p. 10-17.
9. Bernal, H.Y., et al., *Pautas para el conocimiento, conservación y uso sostenible de las plantas medicinales nativas en Colombia.*, in *Estrategia Nacional para la Conservación de Plantas*, H.G.M. Henry Yesid Bernal, Germán Felipe Quevedo Sánchez Editor. 2011: Bogotá, D.C, Colombia.
10. Stevens, P.F. *Angiosperm Phylogeny* 2009; Available from: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
11. Carosio, M.C., et al., *Pavonia Argentina (Malvaceae) nuevo registro para la flora de la provincia de San Luis (Argentina)*. Multequina, 2010. **19**: p. 00-00.
12. Ameenah, G.-F., *Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow*. Molecular Aspects of Medicine, 2006. **27**(1): p. 1-93.
13. Tres, J. *Interacción entre fármacos y plantas medicinales*. in *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*. 2006: SciELO Espana.

14. Gasca, C.S. and F.A. Cabezas, *Evaluación de la actividad antioxidante en el extracto etanólico del cadillo (Pavonia sepioides)*, in *Departamento de Química*. 2012, Universidad del Cauca: Popayán.
15. Miller, J., *The Discovery of Medicines from Plants: A Current Biological Perspective*. Economic Botany, 2011. **65**(4): p. 396-407.
16. Sarkar, D., A. Sharma, and G. Talukder, *Plant extracts as modulators of genotoxic effects*. The Botanical Review, 1996. **62**(4): p. 275-300.
17. Roger, J.P., *Salud Por Las Plantas Medicinales*, S.L. Sa feliz, Editor. 2006: Madrid España.
18. Costa, R.J., Diniz, A., Mantovani, M.S., Jordão, B.Q., *In vitro study of mutagenic potential of Bidens pilosa Linné and Mikania glomerata Sprengel using the comet and micronucleus assays*. Journal of Ethnopharmacology, 2008. **118**: p. 86–93.
19. Neri, M., et al., *Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage: II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2006. **612**(1): p. 14-39.
20. Bussmann, R.W., et al., *Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru*. Journal of Ethnopharmacology, 2011. **137**(1): p. 121-140.
21. Garden., T.o.M.B. 2009; Available from: <http://www.tropicos.org/Name/50070214>.
22. BOVINI, M.G., *Malvaceae s. str. na Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil*. Rodriguésia 2010. **61**(2):**289-301**: p.
23. The Global Biodiversity Information Facility, G. 2010.
24. Colombia, U.N.D. *Colecciones en Linea*. 2011 [cited 2011; Available from: <http://www.biovirtual.unal.edu.co>].
25. Gadano, A., et al., *In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant Chenopodium ambrosioides L.* Journal of Ethnopharmacology, 2002. **81**(1): p. 11-16.
26. Da Silva, C.J., J.K. Bastos, and C.S. Takahashi, *Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of crude extracts of Cordia ecalyculata and Echinodorus grandiflorus*. Journal of Ethnopharmacology, 2009. **127**(2): p. 445-450.
27. Celikler, S., et al., *Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of Codium tomentosum Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes in vitro*. Food and Chemical Toxicology, 2009. **47**(4): p. 796-801.

28. Freyre, S., M. Estrada, and H. Bolaños, *Estudio preliminar de la citotoxicidad y la genotoxicidad de un extracto de origen vegetal conocido como palmo rosado en células meristemáticas de Allium cepa*. 2009.
29. Kayraldiz, A., et al., *The genotoxic and antigenotoxic effects of Aloe vera leaf extract in vivo and in vitro*. Turk J Biol, 2010. **34**: p. 235-246.
30. Ananthi, R., et al., *Genotoxic and antigenotoxic effects of Hemidesmus indicus R. Br. root extract in cultured lymphocytes*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. **127**(2): p. 558-560.
31. Montoro, A., et al., *Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes*. Food and Chemical Toxicology, 2011(0).
32. Martínez, M.M., et al., *Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de Bauhinia variegata L. (Fabaceae)*. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 2011. **16**: p. 313-323.
33. Marques, E.d.S., et al., *Genotoxicity assessment of Garcinia achachairu Rusby (Clusiaceae) extract in mammalian cells in vivo*. Journal of Ethnopharmacology, 2012. **142**(2): p. 362-366.
34. CENIC, CENIC.: Ciencias biológicas, 1990. **1/2**.
35. Lacadena, J.R., ed. *CITOGENETICA*. ed. P. edición. 1996, Editorial Complutense,S.A.: Madrid.
36. Rojas, E., Herrera, L.A., Sordo, M., Gonsebatt, M.E., Montero, R., and R. Rodriguez, Ostrosky-Wegman, P., *Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity*. Anti-Cancer Drugs 1993. **4**(637-640).
37. Helena Curtis, S.B., Adriana Schnek, Alicia Massarini, ed. **BIOLOGIA**. ed. s. edición. 2008.
38. Azqueta, A. and A.R. Collins, *Carotenoids and DNA damage*, in *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2012. p. 4-13.
39. Celik, T.A., *Potential Genotoxic and Cytotoxic Effects of Plant Extracts*. 2012.
40. Obe, G., et al., *Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2002. **504**(1-2): p. 17-36.
41. Mateuca, R., et al., *Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring*. Biochimie, 2006. **88**(11): p. 1515-1531.
42. Miller, B., et al., *Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro*

- micronucleus test*. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 1998. **410**(1): p. 81-116.
43. Ded, A., Human Biomonitoring, 1988(MutatRes 204): p. 353-541.
 44. Hoyos, L.S., S.M. Carvajal, and N.C. Salazar, eds. *manual citogenetica: Linfocitos humanos*. 2002. 2002: Popayan.
 45. Liu, C.-P., et al., *The extracts from Nelumbo Nucifera suppress cell cycle progression, cytokine genes expression, and cell proliferation in human peripheral blood mononuclear cells*. Life Sciences, 2004. **75**(6): p. 699-716.
 46. Passarge, *Genetics: Text and Atlas*, e.m. panamericana, Editor. 2010.
 47. Cabrera, J.C., *Actividad biologica de extractos de plantas usadas para el tratamiento de cancer e infecciones en Tepatepec, Idalgo*. 2005, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO.
 48. Alicia Lamarque, J.Z., Diana Labuckas, Liza López, Mariela Torrez, Damián Maestrí *Fundamentos teorico-practicos de química organica*, G. Encuentro, Editor. 2008: Córdoba, Argentina.
 49. Cannell, R.J., *Natural products isolation*. 1998: Humana Press.
 50. Harborne, A., *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. 1998: Springer.
 51. Beychok, M., *Rotary evaporation laboratory setup*. , R. Evaporation.png, Editor. 2012.
 52. Sánchez Lamar, Á., et al., *Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba*. Revista Cubana de Farmacia, 2000. **34**(1): p. 34-43.
 53. Daniel, M., *Medicinal plants: chemistry and properties*. 2006: Science Pub Incorporated.
 54. Domínguez, X.A., *Métodos de investigación fitoquímica*. Vol. 1. 1973: Limusa México.
 55. Cerdá Zolezzi, P., et al., *Ligaria cuneifolia flavonoid fractions modulate cell growth of normal lymphocytes and tumor cells as well as multidrug resistant cells*. Immunobiology, 2005. **209**(10): p. 737-749.
 56. Duthie, S.J., W. Johnson, and V.L. Dobson, *The effect of dietary flavonoids on DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) and growth in human cells*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 1997. **390**(1-2): p. 141-151.

57. Ahmad, M.S., Sheeba, and M. Afzal, *Amelioration of genotoxic damage by certain phytoproducts in human lymphocyte cultures*. *Chemico-Biological Interactions*, 2004. **149**(2–3): p. 107-115.
58. López-Posadas, R., et al., *Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study*. *Biochemical Pharmacology*, 2008. **76**(4): p. 495-506.
59. Grazul, M. and E. Budzisz, *Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2009. **253**(21): p. 2588-2598.
60. Martínez, A., *Flavonoides in Facultad de Química Farmacéutica*. 2005, Universidad de Antioquia: Medellín.
61. Bruneton, J. and D. Barton, *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. 1991: Acribia.
62. Solís, E.C.G.I.M., *Manual de Fitoterapia* MASSON, Editor. 2007: Barcelona española.
63. de Ugaz, O.L., *ANALISIS FITOQUIMICO Y METABOLITOS SECUNDARIOS*.
64. Mirunalini, S. and M. krishnaveni, *Coumarin: A Plant derived Polyphenol with wide Biomedical Applications*. *International Journal of PharmTech Research*, 2011. **Vol.3, No.3, pp 1693-1696**.
65. Otero, B.R., *Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes*.
66. Hoult, J. and M. Paya, *Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential*. *General Pharmacology: The Vascular System*, 1996. **27**(4): p. 713-722.
67. Ariza, S., et al., *EFFECTOS FARMACOLÓGICOS SOBRE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL INDUCIDOS POR CUMARINA, AISLADA DE Hygrophila tyttha LEONARD*. *Vitae*, 2007. **14**: p. 51-58.
68. Ormeño, E. and C. Fernández, *Los terpenos de las plantas*. *Investigación y ciencia*, 2012(428): p. 62-69.
69. Hasegawa, D.M.M., *Fitoquímica Organica*, Torino, Editor. 2002: venezuela.
70. Teijón, J.M., *Fundamentos de bioquímica estructural*. Vol. 1. 2006: Editorial Tebar.
71. Martínez, A.M., *Esteroides Cardiotonicos in Facultad de Química Farmacéutica*. 2002, Universidad de Antioquia Medellín
72. Abrego Urbina, C.A. and J. Honles Castro, *Identificación, cuantificación y determinación de la actividad citotóxica de los glucósidos cardiotónicos procedentes de las raíces y flores de*

plumeria rubra (flor de mayo), *stemmadenia donnell-smithii* (cojon de puerco) y *thevetia ahouia* (cojon de costa de hojas largas) de la familia apocynaceae. 2012, Universidad de El Salvador.

73. Demma, J., E. Engidawork, and B. Hellman, *Potential genotoxicity of plant extracts used in Ethiopian traditional medicine*. Journal of Ethnopharmacology, 2009. **122**(1): p. 136-142.
74. Vemhes, M., et al., *Efecto tóxico de los extractos acuosos de pinus caribaea y halimeda monile en células humanas. Cytotoxic effect of pinus caribaea and halimeda monile aqueous extracts in human cells*. Revista CENIC. Ciencias Biológicas, 2010. **41**: p. 1-7.
75. Cavalcanti, B.C., et al., *Genetic toxicology evaluation of essential oil of Alpinia zerumbet and its chemoprotective effects against H2O2-induced DNA damage in cultured human leukocytes*. Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(11): p. 4051-4061.
76. Boubaker, J., et al., *Mutagenic, antimutagenic and antioxidant potency of leaf extracts from Nitraria retusa*. Food and Chemical Toxicology, 2010. **48**(8-9): p. 2283-2290.
77. Mara Serpeloni, J., et al., *Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the Miconia genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: An in vitro analysis*. Experimental and Toxicologic Pathology, 2011. **63**(5): p. 499-504.
78. Ríos, J.L., *Effects of triterpenes on the immune system*. Journal of Ethnopharmacology, 2010. **128**(1): p. 1-14.
79. Mendanha, S.A., et al., *Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity*. Toxicology in Vitro, 2012.
80. Mijatovic, T., et al., *Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2007. **1776**(1): p. 32-57.
81. Havsteen, B.H., *The biochemistry and medical significance of the flavonoids*. Pharmacology & Therapeutics, 2002. **96**(2-3): p. 67-202.
82. Pieme, C.A., et al., *In vitro cytotoxicity and antioxidant activities of five medicinal plants of Malvaceae family from Cameroon*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2010. **29**(3): p. 223-228.
83. Egan, D., et al., *Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action of 8-nitro-7-hydroxycoumarin*. Cancer Letters, 1997. **118**(2): p. 201-211.
84. Fotland, T.Ø., et al., *Risk assessment of coumarin using the bench mark dose (BMD) approach: Children in Norway which regularly eat oatmeal porridge with cinnamon may exceed the TDI for coumarin with several folds*. Food and Chemical Toxicology, 2012.

85. Felter, S., et al., *A safety assessment of coumarin taking into account species-specificity of toxicokinetics*. Food and Chemical Toxicology, 2006. **44**(4): p. 462-475.
86. Mendanha, S.A., et al., *Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity*. Toxicology in Vitro, 2013.
87. Moreno, S.M., et al., *COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD TÓXICA*. 2006.
88. Groussin, A.-L. and S. Antoniotti, *Valuable chemicals by the enzymatic modification of molecules of natural origin: Terpenoids, steroids, phenolics and related compounds*. Bioresource Technology, 2012. **115**(0): p. 237-243.
89. Bonassi, S., Norppa, H., Ceppi, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Znaor, A., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., Lazutka, J., Rossner, P., Sram, R.J., Boffetta, P.,, *Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries*. Carcinogenesis, 2008.