



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS CITOGENÉTICO DE LINFOCITOS OBTENIDOS DE LA SANGRE
PERIFÉRICA DE INDIVIDUOS FUMADORES Y NO FUMADORES,
INCUBADOS CON EXTRACTO LIOFILIZADO DE HORCHATA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

MSc. María Eugenia Sánchez Navarro

Autora

Jennifer Valeria Guamangate Guanotuña

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo, Análisis citogenético de linfocitos obtenidos de la sangre periférica de individuos fumadores y no fumadores, incubados con extracto liofilizado de horchata, a través de reuniones periódicas con la estudiante Jennifer Valeria Guamangate Guanotuña, en el semestre 201920, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Eugenia Sánchez Navarro

Magister en docencia universitaria en investigación educativa

C.I. 1709576845

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Análisis citogenético de linfocitos obtenidos de la sangre periférica de individuos fumadores y no fumadores, incubados con extracto liofilizado de horchata, de la estudiante Jennifer Valeria Guamangate Guanotuña, en el semestre 201920, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

José Miguel Álvarez Suarez
Doctor en alimentación y salud
C.I. 1756653372

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que éste trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor viegentes”.

Jennifer Valeria Guamangate Guanotuña

C.I. 0504041708

AGRADECIMIENTOS

A mis padres quienes han sido siempre el apoyo y guía más importante.

A la MSc. María Eugenia Sánchez, que con su paciencia me guio durante la realización de este trabajo de titulación y sin la cual no se hubiera podido llevar a cabo.

Al PhD José Miguel Álvarez por tener la confianza y por permitirme ser parte de esta gran investigación, y quien fue guía importante en el presente trabajo.

A todos quienes forman parte de los Laboratorios de investigación de la UDLA, por brindarme su apoyo en cada paso que se dio para el desarrollo del presente trabajo.

DEDICATORIA

A Dios, quien ha sido un pilar fundamental de fortaleza y apoyo durante toda mi carrera universitaria.

A mi familia, que con su apoyo, amor y paciencia me han sabido guiar y acompañar en toda esta etapa de crecimiento tanto emocional como profesional.

A mis amigos, en especial a Samantha, Isabel y David, que me brindaron su amistad incondicional y que con su cariño y apoyo hicieron de esta etapa de mi vida una gran experiencia.

RESUMEN

La horchata lojana se ha elaborado al sur del Ecuador desde la colonización española, y se ha preparado tradicionalmente como una infusión de plantas entre 16 a 32 especies que pueden ser medicinales o aromáticas cultivadas de forma local. Por muchos años la población indígena del Ecuador ha presumido los posibles efectos terapéuticos, que podrían estar asociados a los compuestos bioactivos que se encuentra en la tradicional bebida. El principal objetivo de esta investigación fue determinar el efecto antígenotóxico de la horchata en las células sanguíneas de personas fumadoras y no fumadoras. Esto se evaluó por medio del test de aberraciones cromosómicas que se presentaron en un cultivo *in vitro* con horchata y sin el mismo. Se reportó que en el porcentaje total de aberraciones cromosómicas no existe diferencia significativa entre los tratamientos. Sin embargo, en los fumadores se pudo encontrar aberraciones de tipo cromosómico que se hallaron en menor proporción en los tratamientos con horchata, determinando un posible efecto antígenotóxico. Asimismo, se logró identificar que no hay una correlación entre las características de los individuos de estudio y la frecuencia de aberraciones cromosómicas por lo que se prevé que sea necesario un número de muestra más grande que permita establecer una tendencia entre los resultados y dichas características. El estudio realizado permitió dar una base de que la bebida horchata se convierta en una posible fuente natural alta en componentes bioactivos con efectos antígenotóxicos de interés medicinal, para futuras investigaciones que se realicen *in vivo*.

ABSTRACT

The horchata lojana has been made in south of Ecuador from Spanish colonization, and has been traditionally prepared as a mixed or infusion of 16 to 32 medicinal or aromatic plants that can be grown locally. For many years, the indigenous population of Ecuador has presumed the possible therapeutic effects, may be related with the bioactive products that are found in the traditional drink. The principal objective of this investigation was to analyze the possible antigenotoxic effects in the blood cells of the smokers and no smokers. It was reported that in the total percentage of chromosomal aberrations there is no significant difference between treatments. However, in smokers you can find chromosomal aberrations that have formed in a greater proportion compared to horchata treatments, I mean, it's posible that an antigenotoxic effect is beging generated in the treatments with horchata. Also, it was not possible to identify a correlation between the characteristics of the individuals studied and the frequency of chromosomal aberrations, so it is expected that a larger sample number will be necessary to establish a trend between the results and said characteristics. This study made it possible to provide a basis for the horchata beverage to become a possible natural source rich in bioactive compounds with biological and antigenotoxic properties of medicinal importance, for future investigations realized out *in vivo*.

INDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Justificación de la investigación.....	5
2. Capítulo II. MARCO TEÓRICO	6
2.1. Generalidades	6
2.1.1. Historia y origen de la horchata	6
2.2. Plantas que componen la horchata lojana	7
2.3. Composición química de la horchata lojana	8
2.3.1. Antioxidantes	8
2.3.2. Fenoles.....	9
2.3.3. Flavonoides	10
2.3.4. Antocianinas	12
2.3.5. Taninos.....	13
2.3.6. Carotenoides	14
2.3.7. Vitaminas.....	16
2.3.8. Aminoácidos	17
2.4. Genotoxicidad	19
2.4.1. Biomarcadores para evaluar la genotoxicidad.....	19
2.4.1.1. Análisis de aberraciones cromosómicas	20
2.4.1.1.1. Aberraciones de tipo cromosómico	20
2.4.1.1.2. Aberraciones de tipo cromátide	22
2.4.1.1.3. Aberraciones de tipo numéricas	23
2.5. Bando cromosómico.....	24
2.6. Tabaquismo	25
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL....	26

4.	CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS.....	27
4.1.	Población	27
4.2.	Preparación del cultivo <i>in vitro</i>	28
4.3.	Procesamientos de cultivos	29
4.4.1.	Análisis citogenético	29
4.4.2.	Bandeo cromosómico	30
4.4.3.	Diseño experimental	30
4.4.4.	Evaluación estadística de los resultados	31
5.	CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
5.5.	Análisis de resultados de los fumadores.....	31
5.6.	Análisis de resultados entre fumadores y no fumadores.....	34
5.7.	Análisis del efecto antígenotóxico de la horchata lojana	36
5.8.	Análisis de bandas en las poblaciones de estudio	39
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	42
6.1.	Conclusiones	42
6.2.	Recomendaciones.....	43
	REFERENCIAS	44
	ANEXOS	59

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Originalmente la horchata se realizaba a base de tubérculo obtenido de la chufa y se consumía en Egipto (2400 a.C.). En Latinoamérica se hace referencia a esta como una bebida que puede contener un sinnúmero de plantas o ingredientes, puesto que, la preparación va a depender de lo que se disponga en cada país de origen. En el sur de Ecuador es una infusión de hierbas tradicionales compuesta de 16 a 32 plantas medicinales y aromáticas (Bailón et al., 2017).

Las plantas medicinales en los últimos años han tomado especial relevancia debido a su gran potencial antiinflamatorio y antigenotóxico que viene dado por algunos compuestos como flavonoides, alcaloides, terpenoides, taninos, esteroides, polifenoles. etc., que pueden prevenir el daño de las células y del DNA (Sabahi, Soltani, & Moein, 2018; Tene et al., 2007). Entre las especies existentes se presta un singular interés al grupo de plantas que componen la horchata lojana, bebida con un potencial uso terapéutico vinculado con enfermedades del sistema digestivo, circulatorio, nervioso y respiratorio (Rios, , Jarrín-v, Donoso, & Romero, 2017). Entre los beneficios que tiene esta infusión, es favorecer considerablemente la inhibición de los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual ayuda a la estabilidad genómica de las células protegiéndolas de posibles aberraciones cromosómicas (AC), además del daño al DNA provocado por distintos agentes genotóxicos. Algunos análisis *in vitro* de células cultivadas con el extracto de horchata han propuesto la posibilidad de utilizar en un futuro la infusión como medida de tratamiento preventivo (Moscoso, Tinitana, Espinosa, Jaramillo, Palacios & Aguilar, 2017).

Un reciente estudio, señaló una extensa investigación de algunas propiedades químicas y biológicas presentes en la horchata lojana. Por medio de la evaluación de linfocitos de humanos, y ovarios de hámster chino, se determinó

que en ninguna se observó citotoxicidad, así mismo, se sugiere que la actividad antioxidante puede estar estrechamente ligada con la antígenotóxica (Bailon et al., 2017). Cabe recalcar que basado en diversos estudios se ha determinado que el consumo de especies vegetales provee de antioxidantes que son capaces de prevenir o retrasar la oxidación que se da por algunas moléculas, por tanto, estas constituyen una fuente principal exógena y lo han sido por mucho tiempo, sin embargo, aunque se han realizado estudios *in vitro* es crucial que se realicen *in vivo* ya que muchas veces los resultados pueden ser contradictorios lo cual representa una limitación en futuras investigaciones (Kasote, Katyare, Hegde, & Bae, 2015).

Se ha probado la actividad antígenotóxica de otras especies como *F. vesiculosus* a través del cultivo de linfocitos humanos que se mide por la frecuencia de aberraciones cromosómicas inducidas por el daño del DNA provocado por la presencia de doxorubicina en el medio. Basado en este ensayo los resultados no fueron prometedores ya que demostraron que el extracto de algas no mostró gran cambio a nivel citogenético cuando se administraba después del antibiótico. Aunque, tomando en cuenta el segundo ensayo se pudo notar que tenía efecto antígenotóxico solo si se administraba previo a la doxorubicina lo cual la clasifica como un antioxidante preventivo secundario mas no primario (Leite, Gusmão, & Takahashi, 2007).

Por otro lado, algunas investigaciones en las que se ha trabajado para conocer el estado de las células después de estar sometidas a estrés oxidativo, han señalado que el número de aberraciones cromosómicas por lo general es superior en las personas fumadoras. Según un estudio realizado con fumadores de una ciudad de Colombia, la frecuencia en las alteraciones del DNA de estas personas son superiores debido a que se exponen a compuestos químicos que finalmente generan actividad mutagénica (Arboleda ,Hoyos, Carvajal, Sierra, 2004). Así también, un estudio realizado en el distrito de Tiruchirappalli de la India obtuvo resultados similares a los anteriormente expuestos, determinando que los fumadores mantienen un aumento

significativo en torno a la formación de AC frente a las personas no fumadoras, también indica que la presencia de actividad genotóxica debido al humo del tabaco efectivamente provoca daño del DNA (Christobher et al., 2017).

1.2. Planteamiento del problema

Actualmente en el Ecuador los estudios enfocados en el análisis citogenético de linfocitos de personas fumadoras son escasos, lo que causa el desconocimiento acerca del estado celular a nivel cromosómico. Así como también de las posibles aplicaciones de compuestos bioactivos presentes en plantas medicinales como las que constituye la horchata, que podrían ayudar a disminuir el efecto que genera el estrés oxidativo en las células, actuando del mismo modo que un sistema enzimático antioxidante como el glutatión, la lactoferrina, el superóxido dismutasa, etc., protegiendo a la célula de los radicales libres (RL) (Aguilar,Cabrera,Iturbide,Molina & Zaldívar, 2013; Tukun et al., 2014). El desconocimiento a nivel bioquímico es amplio ya que para demostrar la eficacia de una planta es fundamental realizar análisis fitoquímicos, farmacológicos, ensayos de toxicidad e inactividad que permitan analizar su posible uso en la medicina tradicional. Se requiere investigación ya que, hasta el momento se han reportado muy pocos estudios en donde se demuestre la capacidad antioxidante que podría tener la horchata. Por otro lado algunos estudios se han centrado en identificar cada una de las plantas que componen esta bebida y han justificado sus posibles efectos beneficiosos basados en reportes bibliográficos (Rios, Tinitana, Jarrín-v, et al., 2017).

En Ecuador, al igual que en muchos otros países, se considera el consumo de tabaco un problema de salud pública, ya que origina graves enfermedades, las cuales generan índices de mortalidad altos (Drope et al; 2018) . En el año 2013 la OPS publicó que el cáncer de pulmón no es una causa creciente de muertes en el país si embargo esto se podría revertir debido a que la prevalencia de jóvenes que consumen tabaco cada día es más alto (OPS, 2013). El INEC ha determinado que el número de egresos diario por enfermedades relacionadas

al sistema respiratorio es de 19,337 personas, que además podría estar relacionado con el consumo de tabaco. (INEC, 2017). Uno de los componentes del tabaco es el benzopireno, cuya toxicidad ha motivado varios estudios debido al efecto que causa en el genoma de la célula por causa de la toxicidad de este compuesto. Se conoce que, provoca fragmentaciones del DNA, que darán lugar a la formación de aberraciones cromosómicas que se visualizan por la aparición de un gap o espaciamiento, roturas, alteraciones en el número de cromosomas, entre otros (Ayarde, Cuti, Ascarrunz, 2008). Así como el compuesto anteriormente nombrado varios otros componentes del tabaco desarrollan aberraciones cromosómicas que implican graves consecuencias biológicas por ello es fundamental aplicar estudios citogenéticos que permitirán medir el daño causado en los cromosomas debido a la exposición a agentes químicos, y complementar estudios que generan alternativas que posiblemente disminuyan el efecto de estas en el organismo (Christobher et al., 2017).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Analizar citogenéticamente los linfocitos obtenidos de la sangre periférica de individuos fumadores y no fumadores, incubados con extracto liofilizado de horchata

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar si el extracto liofilizado de horchata disminuye el daño cromosómico inducido por el estrés oxidativo en personas fumadoras y no fumadoras

- Establecer la frecuencia de aberraciones cromosómicas presentes en linfocitos expuestos a la infusión de horchata de personas fumadoras y no fumadoras.

1.4. Justificación de la investigación

El conocimiento de procesos citogenéticos brinda información que puede ser utilizada en futuras investigaciones, para la prevención y tratamiento efectivo de enfermedades, también puede ser usada para otorgarle a la población un estudio que muestre el efecto que el tabaco va a provocar en su organismo a nivel cromosómico y sus posibles consecuencias sobre salud (Arboleda, Hoyos, Carvajal, & Sierra, 2001). Basado en el problema que causan las especies reactivas de oxígeno en el ser humano, se ha propuesto la idea de utilizar plantas medicinales y aromáticas con el fin exclusivo de identificar si se logra disminuir de algún modo el efecto provocado por el estrés oxidativo en el organismo (Birben, Sahiner, Sackesen, Erzurum, & Kalayci, 2012). Varias especies se han descrito en un estudio etnobotánico que las contempla como remedios naturales que se utilizan en la provincia de Zamora Chinchipe y Loja demostrando la efectividad de alrededor de 275 plantas con distintos usos terapéuticos (Tene et al., 2007).

Dentro de las especies o plantas que causa mayor interés se encuentra la mezcla de plantas que compone la horchata lojana, esto debido a que bioquímicamente se ha demostrado que posee características antioxidantes y antiinflamatorias que podrían disminuir el efecto causado por las especies reactivas de oxígeno (Moscoso, Tinitana, Espinosa, Jaramillo, Palacios & Aguilar, 2017). Por lo tanto, la empleabilidad de esta mezcla como una terapia antioxidante que además es de origen natural abre las puertas a una nueva alternativa para la prevención y disminución de enfermedades que estén vinculadas al estrés oxidativo, lo cual aporta con información nueva sobre la respuesta antioxidante de plantas en base al análisis citogenético. El presente estudio busca impulsar la idea de utilizar una bebida que posea compuestos bioactivos que puedan llegar a presentar una respuesta antioxidante frente al estrés oxidativo generado por el hábito de fumar en una persona, lo que permitiría demostrar su uso como fuente natural con importantes efectos

biológicos para la salud. Al ser altamente accesible para la población Ecuatoriana podría ser implementada a la dieta como una alternativa para la prevención de enfermedades que se relacionen con el estrés oxidativo (Birben et al., 2012).

2. Capítulo II: MARCO TEÓRICO

2.1. Generalidades

2.1.1. Historia y origen de la horchata

La horchata se originó en Egipto a principios del año 2400 a.C. y se realizaba a base de un tubérculo llamado *Cyperus esculentus*, el cual aún se cultiva para uso medicinal en el sur de Europa (De Castro, Gargiulo, Del Guacchio, Caputo, & De Luca, 2015). Existe evidencia de que esta bebida se encontró en los vestigios de algunos faraones, la "horchata de chufa", cómo se la llama comúnmente, posee un gran valor cultural por su registro en la medicina Egipcia del Papiro Ebers. Más tarde (30 a.C.), el imperio romano conquistó Egipto, por consecuencia introdujeron la bebida a su territorio y cultura. En el año 1200 El rey Jaime I bautizó esta bebida como "oro, chata", posteriormente bajo la voz latina que surgió en Valencia la nombraron orzata, hordeãta u hordiate que delimitó el termino español horchata (Rios, Tinitana, Jarrín-V, Donoso, & Romero, 2017).

En países de América Latina, se han determinado un gran número de bebidas bajo el nombre de horchata, esto debido a que puede estar compuestas por distintos ingredientes que van a depender del país de origen. Por ejemplo: en México se conoce a esta bebida como aguas frescas y se compone de arroz, canela, almendras, azúcar y vainilla; en Venezuela en cambio se utiliza agua, sésamo, y azúcar; pero en esta región se la denomina chicha (Beck, Fernandez, Rojina, & Cabana, 2017) . En el sur del Ecuador más específicamente en la provincia de Loja, la horchata es muy popular por que se cree que posee propiedades medicinales, especialmente entre los indígenas

quienes aseguran basados en conocimientos ancestrales que esta tiene efectos terapéuticos siempre y cuando la combinación de las plantas sea la adecuada. Cabe destacar que la horchata lojana es una infusión de hierbas de 16 a 32 plantas aromáticas y medicinales. Su color característico viene dado por *Amaranthus hybridus* o ataco y *Aerva sanguinolenta* o escancel que la hacen rojiza y vistosa al consumidor (Peralta, Villacrés, Mazón, Rivera & Subía, 2008).

2.2. Plantas que componen la horchata lojana

Las plantas aromáticas y medicinales destinadas para la elaboración de la tradicional horchata lojana, por lo general es comercializada como manojo, ramillete o tongo (Tinitana, Rios, Romero, de la Cruz Rot, & Pardo, 2016, p. 5).

Un nuevo estudio, estableció que para la preparación de la horchata se utiliza el mayor número de especies medicinales reportado hasta el momento, a diferencia de cualquier otra bebida realizada a base de plantas en el Ecuador. Los estudios taxonómicos determinaron que las plantas corresponden a un total de 71 especies que se agrupan en 33 familias y 58 géneros, de los cuales 3 son endémicas de los andes ecuatorianos, 29 son nativas y 38 introducidas (Anexo 1). Cabe recalcar que según datos otorgados por distintos estudios existen 16 especies utilizadas con mayor frecuencia y que son esenciales para la elaboración de la bebida ya que proporcionan su aroma, sabor y color (Rios, Tinitana, Jarrín-V, et al., 2017). Entre las que proporcionan color están *Amaranthus hybridus* y *Aerva sanguinolenta*, para el sabor *Dianthus caryophyllus*, *Foeniculum vulgare*, *Borago officinalis*, *Bogotense equisetum*, *Fuchsia hybrida*, *Semitriloba triumfetta*, *Matricaria recutita*, *Pelargonium odoratissimum*, *Melissa officinalis*, *Citrus x junos* y finalmente *Plantago major*, mientras que el aroma viene dado por *Alysia triphylla*, *Alcea rosea*, *Menta spicata* y *Cymbopogon citratus*.

Por otro lado, una de las características que se toma en cuenta para la elaboración de la bebida es su estructura morfológica y sus componentes, existen aproximadamente once tipos de formas en las que se pueden tomar a las plantas; se utiliza en mayor cantidad las hojas con un 23%, en un 22% les siguen las flores, mientras que las ramas se utilizan en un 14%, 12% para las plantas que no poseen raíces y por último los pétalos en un 5%.

Los distribuidores de estas plantas en el mercado, han atribuido una serie de usos terapéuticos, predominando el uso antiinflamatorio, seguidamente se utilizan como diuréticos, analgésicos, y finalmente algunas de las plantas se utilizan entre tónicos, hepáticos, sedantes o incluso digestivos (Figura1).

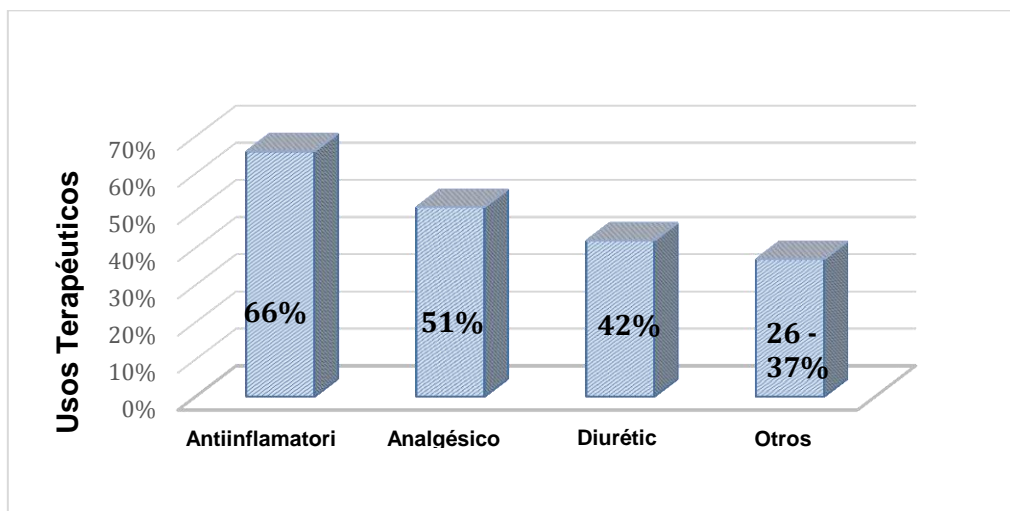


Figura 1. Usos terapéuticos de las plantas que componen la horchata lojana
Adaptado de (Rios, Tinitana, Jarrín-v, et al., 2017).

2.3. Composición química de la horchata lojana

2.3.1. Antioxidantes

Los antioxidantes actúan como defensas que desempeñan un papel crucial en la prevención de procesos relacionados con enfermedades cardiovasculares, cataratas, degeneración muscular, funciones inmunológicas, e incluso cualquier

tipo de enfermedad relacionada con el cáncer (Nakilcioğlu, 2013). Las fuentes pueden ser artificiales o naturales, así como también exógenos o endógenos, las plantas por ejemplo actúan como una fuente exógena muy importante ya que generan una gran cantidad de antioxidantes naturales como los fenoles, flavonoides, entre otros.

El ser humano posee radicales libres que se producen de forma natural como subproductos del metabolismo y que somete al organismo a un estrés oxidativo, por lo general el sistema antioxidante del cuerpo humano puede cubrir este efecto por medio de un sistema reparador lo cual permite mantener un equilibrio entre el sistema oxidante y el anti-oxidante. Sin embargo, el consumo de alcohol, tabaquismo, radiación, o las toxinas del medio ambiente producen un exceso de especies reactivas de oxígeno que hacen que el equilibrio se interrumpa, desembocando en varias enfermedades crónicas (Xu et al., 2017). El consumo de antioxidantes exógenos disminuye el daño generado por los radicales libres inhibiendo la reacción en cadena oxidativa, eliminando RL, actuado como agentes reductores, y minimizando la acción del oxígeno libre (Baiano & Del Nobile, 2016).

2.3.2. Fenoles

Los fenoles son metabolitos secundarios que no solo realizan funciones fundamentales para las plantas, sino que además favorecen al bienestar humano al desempeñar su rol como antioxidantes (Mahmoudi, Khali, Benkhaled, Benamirouche, & Baiti, 2016). Dicha capacidad antioxidante va a disminuir o aumentar su efecto según la interacción que exista entre ellos o también con otros compuestos. Este efecto que presentan los ácidos fenólicos viene dado por su estructura química, ya que va a mejorar a medida que aumenten los grupos metoxilo e hidroxilo (OH), aunque este último es el más importante ya que su posición y el número de OH en la estructura de un compuesto fenólico permitirá donar un átomo de hidrogeno o un electrón (López, Santacruz, Navarro & Sotelo, 2015).

Una fuente amplia y esencial de fenoles son los organismos vegetales, razón por la que en los últimos años se ha implementado el uso de extractos herbales en las industrias farmacéuticas, alimentarias y cosméticas. El alto contenido de ingredientes biológicos activos se acumula en las plantas y se encuentra ampliamente relacionado con el desarrollo y actividad vital de las mismas. Cabe mencionar que la etapa de floración ha reportado el contenido máximo de fenoles, aunque, esto va a depender de cada tipo de especie (Syta, Hemmerich, Zivcak & Rauh, 2018).

Hasta el momento se ha considerado que la acción antioxidante puede estar relacionada con la actividad antígenotóxica (Bailon et al., 2017). Los ácidos hidroxicinámicos forman parte de los ácidos fenólicos y tienen especial relevancia por tener actividad antiproliferativa y antígenotóxica en las células. Como se puede ver en la figura 2, la presencia de un grupo $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ potencia la resonancia química debido a la formación de un doble enlace carbono-carbono que estabiliza a los radicales libres, y por ende la capacidad antioxidante aumenta (Peñarrieta et al, 2014).

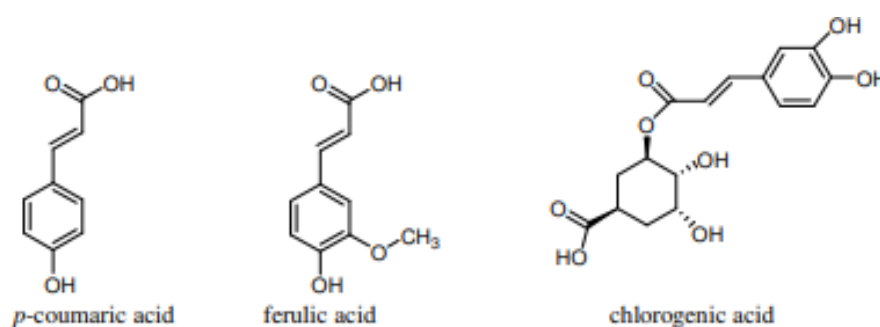


Figura 2. Estructura química de algunos ácidos hidroxicinámicos.

Adaptado de (Peñarrieta et al, 2014).

2.3.3. Flavonoides

La palabra flavonoide o "flavus" como su nombre latín lo indica, se refiere al color amarillo que se ha localizado en algunos flavonoides purificados. Por lo

general se atribuyen el color de los frutos y las flores que presenta cada especie (Peñarrieta et al, 2014).

Se denomina flavonoides al grupo de fenoles que contiene distintas subclases como los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, anticianidinas, etc. Los flavonoides se pueden localizar en algunas plantas medicinales que se utilizan para la elaboración de fitofármacos por lo que son fundamentales para la salud humana (Howes, 2018). Algunos estudios han respaldado el mecanismo de acción que poseen los flavonoides al actuar como antiinflamatorias, antioxidantes, cardioprotectores, antibacterianos y varias otras actividades biológicas (L. Wan & Jiang, 2018), por lo que el consumo de plantas con estos compuestos pueden ser los responsables de varios efectos terapéuticos que favorecen al organismo (De Almeida et al., 2017).

La antigenotoxicidad de estos compuestos ha sido estudiada durante varios años para corroborar que efectivamente pueden proteger a las células pero que su actividad no necesariamente se relaciona con la actividad antioxidante, sino que actúan como fotoprotectores en el caso de mutaciones generadas por radiaciones ultravioletas (García, Villamizar, Núñez, Ocazonez & Stashenko, 2019). En cambio, en mutaciones generadas por tabaco facilita la protección contra efectos nocivos que se dan por los carcinógenos presentes en este, ya que al ingerir fenólicos dietéticos logra proteger parcialmente a las células de sustancias tóxicas a las que desestabiliza con las enzimas antioxidantes (Nakamura et al., 2015).

En la figura 3, tenemos la estructura química general de un flavonoide, el cual se compone de tres anillos, el primero es dihidroxilado en la posición 7 y 5, el segundo es fenólico por lo general mono u orto-dihidroxilado que contiene un grupo metoxi, y finalmente el anillo de carbono.

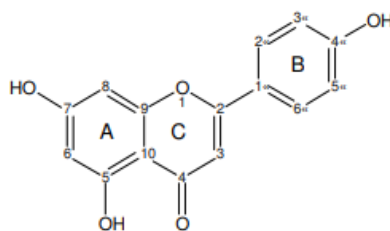


Figura 3. Estructura química general de un flavonoide
Adaptado de (Peñarrieta et al, 2014)

2.3.4. Antocianinas

Las antocianinas son una subclase de flavonoides que se encuentran distribuidos ampliamente en los alimentos. Estos son los responsables de generar el color morado, naranja, azul, rojo y violeta, en las flores y frutos de las plantas, la cianidina es la más común en las especies vegetales (Peñarrieta et al, 2014). En las plantas cumple un rol esencial ya que permite su interacción con el medio ambiente al representar la primera vía de defensa contra la radiación UV, los radicales libres y el daño ocasionado por distintos patógenos por lo que son cruciales para el desarrollo de especies vegetales (Castro et al., 2013).

La ingesta de alimentos ricos en antocianinas favorece considerablemente al desarrollo celular, ya que actúan potenciando la actividad de enzimas antioxidantes, así también al aumentar la ingesta tiene efectos beneficiosos contra el estrés oxidativo lo cual favorece al sistema respiratorio, ya que se ha encontrado varios estudios en donde se relaciona fielmente el consumo de alimentos altos en antocianinas con la función pulmonar (Mehta et al., 2016).

En la figura 4 se puede observar la estructura química general de una antociana, misma que se compone de un grupo hidroxilo en el anillo B y un catión de pirulina que se toma como el anillo C, por medio de estos se eliminan los RL, en primer lugar, está el ion hidroxilo que es la primera vía y la segunda es el ion oxonio en el anillo de carbono. Son estos los que hacen de las

antocianinas potentes agentes reductores en la transferencia de electrones (Khoo, Azlan, Tang, & Lim, 2017).

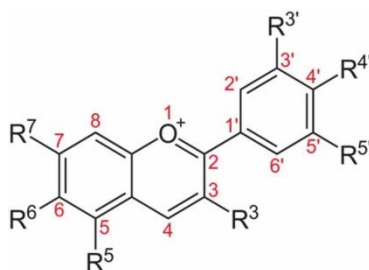


Figura 4. Estructura química general de una antocianina.

Adaptado de (Khoo et al., 2017).

2.3.5. Taninos

Los taninos forman parte de los compuestos fenólicos con la singularidad de que al unirse a las proteínas se precipitan, estos se encuentran presentes en la corteza, frutas y hojas, por lo que, son necesarios para la protección de las plantas de herbívoros e infecciones. Se clasifican en tres grupos: condensados, hidrolizables, y complejos (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila, & Bravo, 2014). Los tres grupos de taninos se encuentran dentro de las vacuolas de las células vivas, no obstante, cuando se produce muerte celular los compuestos se liberan al citoplasma (Maier, Oelbermann, Renner, & Weidner, 2017)

En la actualidad los taninos han tomado especial relevancia debido a su potencial nutricional ya que favorece como antimutagénicos, antidiabéticos y antimicrobianos, lo cual está asociado a su capacidad antioxidante (Olivas et al., 2015). Varios estudios han demostrado el posible uso de fuentes de desecho de origen vegetal como una fuente ampliamente rica en polifenoles como los taninos, que permitan sustituir el uso de antioxidantes químicos sumamente costosos (Aires, Carvalho, & Saavedra, 2016; Rodrigues, Pimentel, & Oliveira, 2015; Tavares et al., 2015).

A nivel antigenotóxico los distintos ensayos plantean que los taninos le proporcionan a las células protección de cualquier daño en la estructura primaria del DNA, lo que representa un gran avance para proponer el empleo de modelos animales basados en experimentación *in vivo* que permita buscar respuestas sobre los mecanismos de protección (González-Pumariega et al., 2016).

La estructura química de los taninos se compone en un anillo tal como se puede observar en la figura 5, la estructura de este grupo de moléculas va a cambiar de acuerdo al azúcar del que este compuesto y el número de enlaces que presente (Olivas-Aguirre et al., 2015).

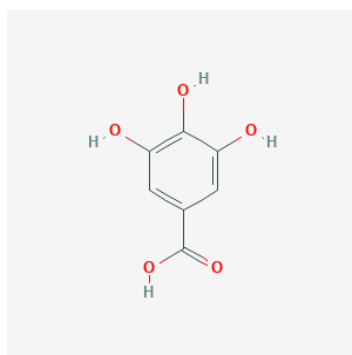


Figura 5. Estructura química de un tipo de tanino llamado ácido gálico. Adaptado de (Kim et al., 2019).

2.3.6. Carotenoides

Los carotenoides son de un amplio grupo de 700 pigmentos liposolubles que se localizan en las plantas (Britton, Liaaen-Jensen, & Pfander, 2012), aunque también se han logrado identificar en mohos, levaduras y bacterias; en las plantas a diferencia de las otras especies, los carotenoides son indispensables para la fotosíntesis. Por otro lado, en los animales estos deben ser adquiridos por la dieta y desempeñan el papel de antioxidantes. Se conoce que los

carotenos son precursores del retinol o vitamina A, sin embargo, en los humanos parece desempeñar la protección ya que son inhibidores del oxígeno libre por lo que actúan de forma eficiente al eliminar las especies reactivas de oxígeno (Fiedor & Burda, 2014).

Algunos carotenoides que se pueden obtener de forma exógena son el α y β caroteno, luteína, licopeno, crocentina, entre otros (Carranco, Calvo & Pérez, 2011). Varios estudios han propuesto la ingesta de frutas, vegetales y plantas que se asocian directamente al bienestar de la salud, en especial para aquellas poblaciones que por su estilo de vida son más propensos a tener enfermedades catastróficas.

Los carotenoides permiten el cambio oxidativo del estado redox de las células lo que permite el equilibrio frente al estrés oxidativo, como por ejemplo aquellos generado por el hábito de fumar, es decir que neutraliza los prooxidantes con el fin de prevenir el daño de estructuras biológicas (Palozza, Simone, & Mele, 2008). El tabaquismo por ejemplo, es un factor de riesgo muy importante para el cáncer de pulmón o enfermedades asociadas al sistema respiratorio (Acosta, Remón, Segura & Ramírez, 2016).

Es importante recalcar que la actividad antioxidante va a depender en gran medida de la estructura química del compuesto, ya que esta permitirá retirar el oxígeno libre a través de su tamaño, configuración cis o trans, etc. Los carotenoides se componen de una larga cadena, en la figura 6 se puede observar la estructura del β -caroteno, el cual hasta el momento ha reportado la mayor actividad antioxidante (Melendez, Vicario, & Heredia, 2004).

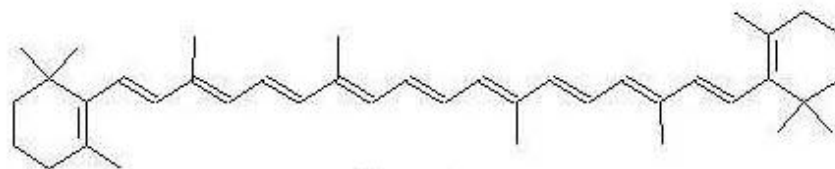


Figura 6. Estructura química del β - caroteno localizado en plantas medicinales. Adaptado de (Melendez et al., 2004).

2.3.7. Vitaminas

Las vitaminas que se encuentran en las plantas tienen una gran importancia en la salud humana, esto debido a su gran trabajo como coeficientes enzimáticos y a su potencial redox tanto en plantas como en animales (Asensi & Munné, 2010). Las vitaminas han sido ampliamente estudiadas por su efecto antimutagénico, la vitamina E y C por ejemplo, han sido altamente eficientes contra las alteraciones cromosómicas producidas por la doxorubicina, pesticidas entre muchos otros agentes genotóxicos (Bhattachar, 2011).

Las industrias se centran cada día más en la fabricación de alimentos que contengan suplementos, los pigmentos y vitaminas vegetales son de los aditivos más comunes no solo por la coloración que otorga sino también por fines terapéuticos (Buchhaupt, Kähne, Etschmann, & Schrader, 2014). Algunas vitaminas presentes en las plantas son el ácido ascórbico, cuyo papel se centra en inhibir la nitrosación, mientras que la vitamina D3 favorece a los agentes protectores de las células, los tocoferoles y el ácido ascórbico ayudan a eliminar ROS, y así se puede mencionar un sin número de efectos positivos que se presentan en el organismo por el consumo adecuado de alimentos ricos en vitaminas (Izquierdo et al., 2017).

Las vitaminas son compuestos que los seres humanos no sintetizan por lo que deben ser adquiridos en la dieta, la falta de una sola de estas puede representar graves problemas de salud (Asensi & Munné, 2010). Una de las vitaminas con alto potencial nutricional es la vitamina C que es un donante de

electrones nato, por lo que actúa como un potente antioxidante y además se puede localizar en varias plantas (Padayatty et al., 2003), químicamente está conformado por seis carbonos mismo que se conecta con las hexosas y otra glucosa (Kim et al., 2019).

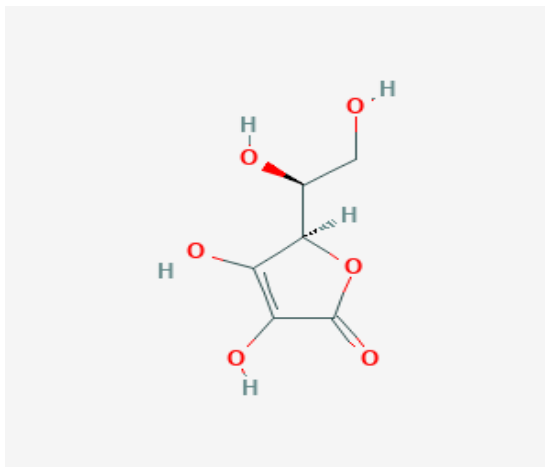


Figura 7. Estructura química del ácido ascórbico (Vitamina C).

Adaptado de (Kim et al., 2019).

2.3.8. Aminoácidos

Los aminoácidos se forman de la hidrólisis proteica (Almeida, 2018). Las proteínas son la fuente principal de aminoácidos los cuales se unen por medio de enlaces peptídicos entre grupos amino y carboxilo, cabe recalcar que la proteína tiene importancia en la dieta de las personas por su capacidad de otorgar aminoácidos que son fundamentales por su valor nutricional en el mantenimiento corporal. Además de que en personas adultas la falta de aminoácidos en el cuerpo aumenta su mortalidad y alteraciones de tipo patológico (Martínes & Martínez de Victoria., 2006).

Una fuente de aminoácidos son las plantas, aunque, las células vegetales contienen niveles menores en comparación con las células animales (Hildebrandt, Nunes Nesi, Araújo, & Braun, 2015). Estos compuestos cumplen

funciones cruciales para el desarrollo y sobre todo para la señalización ya sea de especies animales o vegetales (Häusler, Ludewig, & Krueger, 2014).

Las especies vegetales son ricas en nutrientes disponibles que vienen dados por la presencia de aminoácidos, lo cual otorga propiedades funcionales que benefician el organismo animal es por tanto que la demanda de plantas que contengan un alto contenido proteico genera altas expectativas ya que es un potencial agente para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Ruiz, Betancur & Segura, 2014). Además, se conoce que los aminoácidos tienen una correlación con la actividad antioxidante por lo que potencialmente eliminan radicales libres (Wu, Chen, & Shiau, 2003).

Algunos aminoácidos potenciales que se han logrado identificar en las plantas son la glicina, tirosina, metionina, fenilalanina, alanina, entre otros. Como se había mencionado antes existen algunos aminoácidos implicados en la señalización celular los cuales en efecto son la leucina, serina y prolina presentes también en estas especies que componen la horchata (Hildebrandt et al., 2015). La estructura común de los aminoácidos se puede visualizar en la figura 8, cabe denotar que cualquier estructura que posea un grupo amino va a ser considerado un aminoácido, se considera que estas moléculas son las más importantes para los sistemas biológicos y se cree que cada célula viva en la tierra utiliza el mismo conjunto de 20 aminoácidos para sus funciones biológicas.

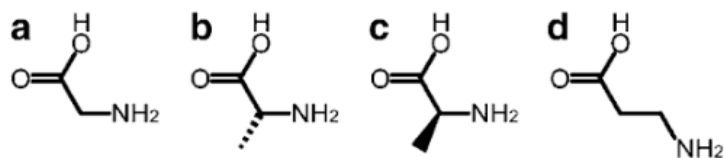


Figura 8. Estructura química de compuestos con grupos amino.

Adaptado de (Fleck & Petrosyan, 2014).

2.4. Genotoxicidad

La genotoxicidad es la facultad que poseen algunos agentes para ocasionar daños al material genético. Sin embargo, el daño provocado no solo afecta al DNA, sino también a todos los componentes celulares que se relacionan con el comportamiento y la funcionalidad de los cromosomas en la célula (Izquierdo et al., 2017).

La mayoría de los organismos están sujetos a daños en el DNA provocados por procesos endógenos o también por agentes exógenos (Swift & Golsteyn, 2014). Cuando han sido afectados por dichos agentes pueden provocar mutaciones que se dividen en negativas, positivas, neutrales, sub-letales y letales (Ślarczyńska, Powroźnik, Pękala, & Waszkielewicz, 2014). La forma de evaluar la genotoxicidad se basa en las alteraciones que se provocan en los cromosomas debido a mutaciones o cambios. Una de ellas es la mutación genética que causa daños puntuales que afectan a bloques de genes, así también está la clastogenicidad que se basa en los cambios estructurales y finalmente la aneuploidía que analiza aberraciones cromosómicas que afectan el número de cromosomas (Eastmond et al., 2009).

2.4.1. Biomarcadores para evaluar la genotoxicidad

Para analizar todos estos procesos existen algunas pruebas como la de micronúcleos que se especializa en evaluar la capacidad que tiene un compuesto para romper los cromosomas o para dañar su huso mitótico, apoyado en resultados estadísticos, lo que ha permitido por mucho tiempo dividir a distintas sustancias en agentes cancerígenos o no cancerígenos (Nai et al., 2015).

Otra técnica de análisis es el ensayo cometa que fue descrito por Rydberg y Johanson en 1978 (Rydberg & Johanson, 1978). El ensayo cometa analiza células individualmente además de que se puede aplicar a varias poblaciones,

(Torres, Osorio, Murillo, Duque, & Jaramillo, 2014). En la actualidad esta técnica se utiliza para evaluar el grado de fragmentación del DNA y se basa en el análisis de núcleos completos que muestren patrones de migración del DNA dependiendo del nivel del daño que se haya producido (Cortés et al., 2011). Los parámetros que se utilizan para esta técnica son la intensidad, migración, y longitud de cola, esta última mostrará distintos tamaños según el nivel del daño que posea la célula, cabe recalcar que por lo general este ensayo es utilizado fundamentalmente para biomonitorización humana (Montes, De la Ossa, & Pérez, 2017; Ansoar, Fontanetti, & Díaz, 2015).

2.4.1.1. Análisis de aberraciones cromosómicas

2.4.1.1.1. Aberraciones de tipo cromosómico

Otra de las técnicas que permiten este análisis es la prueba de aberraciones cromosómicas, misma que se ha utilizado a lo largo de los años como biomarcador para estudios de células expuestas a radiación o agentes químicos, al cuantificar los cambios estructurales generados en los cromosomas, después del daño celular (Guimarães et al., 2014). Las aberraciones cromosómicas son un indicativo de fragilidad (Figura 9), las cuales pueden verse en distintas formas como: deleciones terminales que se presentan como una simple rotura, mientras que las isodiamétricas van a formar esferas pareadas de cromatina, en general se atribuye a este grupo de deleciones la formación de anillos cromosómicos (Behrend, Karimzad, Mehdipour, & Schwanitz, 2017) .

La lesión producida por anillos acéntricos se caracteriza por involucrar a dos fragmentos de cromátidas que no poseen centrómero y que al estar rotos se unen formando un anillo (Sureka & Armpilia, 2017). Por otro lado, también se encuentran los anillos céntricos que se puede presentar por la rotura de doble cadena de un solo cromosoma que se recombina para formar la estructura cíclica y en la fase S forman un par de cromosomas con anillos superpuestos que generalmente están acompañados de fragmentos de cromosomas

acéntricos que se perderán en la mitosis (McParland, 2010). Otro tipo de lesiones son producidas por inversiones que se dividen en: paracéntricas cuya rotura o punto de interrupción se va a observar en el mismo brazo cromosómico, a diferencia de las inversiones pericéntricas que se caracterizan por la posición del centrómero dentro de la región invertida, es decir, que ambos puntos de ruptura tanto en el brazo corto como en el largo cambiarán el índice del centrómero (Behrend et al., 2017).

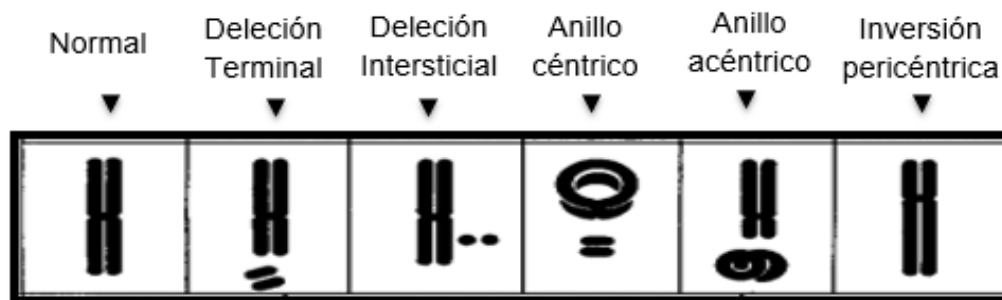


Figura 9. Aberraciones cromosómicas frente a un cromosoma normal.

Adaptado de (Tubiana, Dutreix, & Wambersie, 2005).

También se puede encontrar translocaciones en el cromosoma, siendo las más comunes las translocaciones recíprocas o intercambio simétrico (Figura 10), mismas que se producen cuando el segmento de un cromosoma se intercambia con el segmento de otro cromosoma no homólogo, estas son inducidas por el inicio de mecanismos de reparación después de la introducción de roturas en el DNA debido a mutágenos (Bhat & Wani, 2017). También se pueden encontrar cromosomas dicéntricos (Figura 10), cuyo origen implica el intercambio entre dos cromosomas cada uno con su respectivo centrómero, en el cual cada uno sufre una rotura cromosómica de tal manera que generan extremos pegajosos, estos al encontrarse cerca uno del otro tienden a formar uniones de cromosomas (Levitt, Purdy, Perez, & Poortmans, 2012).

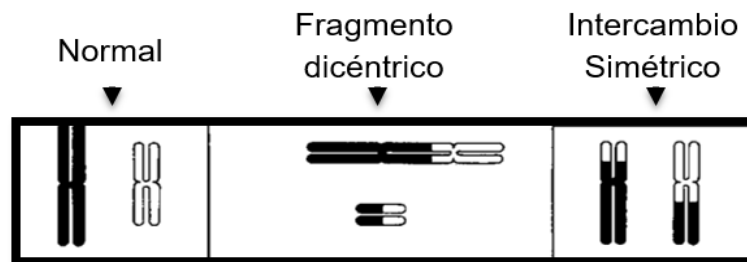


Figura 10. Aberraciones cromosómicas frente a un cromosoma normal.
Adaptado de (Tubiana et al., 2005).

2.4.1.1.2. Aberraciones de tipo cromátide

Como se ha mencionado previamente también se puede estudiar la fragilidad cromosómica que se reconoce por alteraciones cromosómicas que afecten ya sea a una o las dos cromátidas del cromosoma o de cromátide. La fragilidad se evidencia como, aquellos espacios susceptibles de presentar un gap o fractura cuando se ha expuesto al cromosoma a una inhibición parcial en la replicación del DNA (Llambí & Núñez, 2007). Esto provoca que la cromatina se vea gravemente interferida al compactarse durante la mitosis por lo que se da una replicación más tardía frente al resto del cromosoma (Escribano, Castillo, Daher, Salazar & Tobella, 2009).

Este tipo de aberraciones se pueden ocasionar por agentes químicos y virus que causan daños a un solo brazo del cromosoma. Estas aberraciones son consecuencia de errores en la replicación que ocurren en la síntesis del DNA, o S, en la fase posterior a la exposición (Evans & O’Riordan, 1975).

Las aberraciones de cromátida implican el daño en un lugar determinado de solo una cromátida del cromosoma. Un ejemplo es el gap cromático que se denota como una región sin tinción, comúnmente se da por la delineación mínima de la cromátida. Así mismo la rotura o break de cromátida se puede notar por una discontinuidad de una cromátida en la que hay una clara

desalineación, mientras que el intercambio de cromátidas es el resultado de dos o más lesiones de cromátidas que reorganizan su material y generan un intercambio (Shaffer, & Tommerup, 2005) (Figura 11).

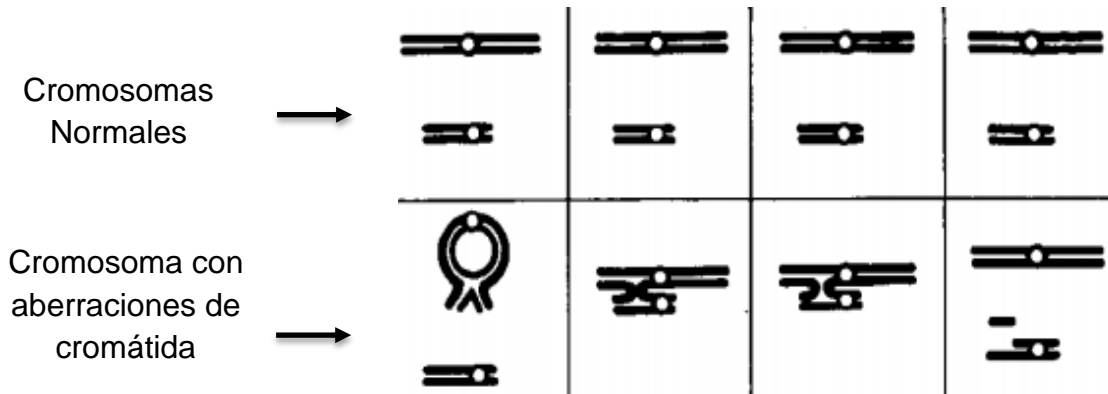


Figura 11. Aberraciones de cromátida frente a un cromosoma normal
Adaptado de (Evans & O’Riordan, 1975).

2.4.1.1.3. Aberraciones de tipo numéricas

La alteración numérica que se denomina hipodiploidía cuando el contenido cromosómico es menor al número normal de cromosomas y se encuentra entre los 24 y 39 o simplemente es menor a 46 (Safavi & Paulsson, 2017). Por otro lado, la hiperploidía ocurre en cambio cuando supera los 23 pares de cromosomas y se denomina hiperploidía alta cuando el número es mayor a 50 (Feliu, 2001; Provan, Baglin, Dokal, & Vos, 2017), véase ambos casos en la imagen 12 y 13.



Figura 12. Metafase con hiperdiploidía que posee 75 cromosomas.
Adaptado de (Llimpe, 2007)

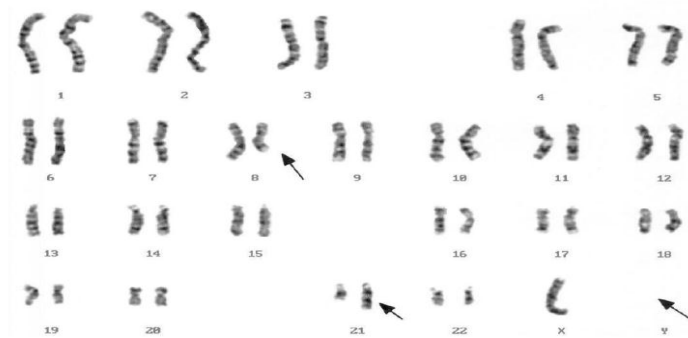


Figura 13. Cariotipo con hipodiploidía con un cromosoma sexual faltante.
Adaptado de (Llimpe, 2007).

2.5. Bando cromosómico

Un análisis puntual de alteraciones cromosómicas o enfermedades que vienen ligados a procesos genéticos se puede dar por medio del bandedo cromosómico. Esta técnica se ha vuelto muy popular por el análisis puntual de estructuras cromosómicas que tenga distinto tamaño en los 23 pares de cromosomas. Dicha herramienta de la citogenética permite identificar cada uno de los cromosomas de un ser vivo. Asimismo, permite localizar de forma puntual la rotura que se pueda generar en un reordenamiento estructural para determinar qué tipo de cromosoma se involucra en dicha aberración cromosómica (Miller & Therman, 2001; Sindicato Médico del Uruguay. & Fundación Universitaria de Ciencia. Oficina del Libro., 2002)

De la misma manera se puede utilizar esta técnica para el análisis de poblaciones a las que se les sugiere síndromes o enfermedades ligadas a los genes, por lo que es crucial para descartar que alguna persona tenga enfermedades de carácter hereditario y no por razones externas como el medio ambiente (Schreck & Distéche, 2001).

2.6. Tabaquismo

El consumo de tabaco ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud como una prioridad de estudio para los países en vías de desarrollo. La ciencia contempla este hábito como un inductor de enfermedades pulmonares, ateroscleróticas del corazón, además del más relevante que es el cáncer (Kuri, P., González, Jesús., Hoy, M., Cortés, 2006). El humo del tabaco se compone de alrededor de 5311 compuestos químicos, muchos de ellos farmacológicamente tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos. Entre los principales problemas que se ocasionan por estos compuestos está la fragilidad y las aberraciones cromosómicas, daños al material genético, entre otros (Jeanes, Hall, Proteggente, & Lodge, 2004).

La presencia de metales pesados, aldehídos, nitrosaminas son potencialmente altas en el humo del cigarrillo, así como también, los radicales hidroxilo, o las quinonas, mismos que en grandes cantidades aumentan el estrés oxidativo (Asgary, Naderi, & Ghannady, 2005). El impacto que tiene este hábito puede perdurar en el organismo por mucho tiempo (E. S. Wan et al., 2012). La nicotina por ejemplo, se demora en llegar al cerebro de 10 a 12 segundos, pero su efecto aunque va disminuyendo se mantiene alto durante las próximas 11 horas y le toma más tiempo ser eliminado del cuerpo en forma de cotinina, o incluso puede ser reciclado (Benowitz, Hukkanen, Jacob, & III, 2009).

La sangre de una persona fumadora presenta trastornos sanguíneos ya que, en comparación con los eritrocitos de una persona no fumadora, el contenido intracelular y la membrana se encuentran sumamente dañados debido al ataque químico causado por el humo del cigarrillo inhalado (Masilamani, AlZahrani, Devanesan, AlQahtani, & AlSalhi, 2016). Los daños por lo general se ocasionan en la superficie de las células sanguíneas ya que están expuestas constantemente al efecto genotóxico, el daño ocasionado es acumulativo ya que algunos compuestos como el monóxido de carbono tiene 200 veces más afinidad con la hemoglobina de tal forma que constantemente está generando carboxi-hemoglobina (Hale, Winlove, & Petrov, 2011).

3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

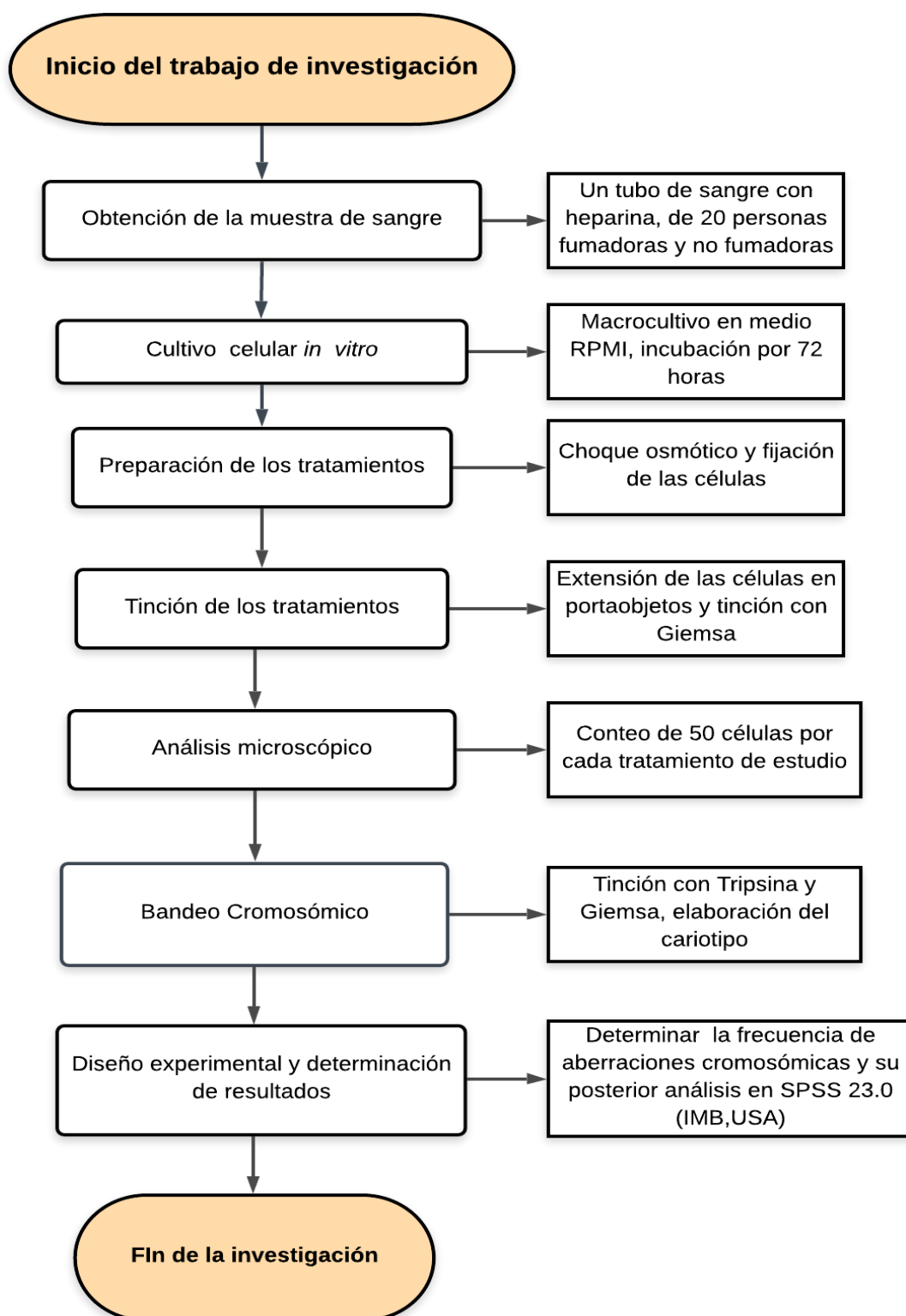


Figura 14. Diagrama del plan experimental del presente trabajo

4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

4.1. Población

Para realizar el estudio citogenético de esta investigación se tomó muestras de 19 individuos fumadores y 20 individuos no fumadores, de cada uno de ellos se extrajo un tubo de sangre periférica con heparina como anticoagulante. Las condiciones solicitadas a los individuos incluidos en el estudio fueron: acudir en ayunas con una dieta que impedía el consumo de té, frutos rojos y sobretodo horchata por una semana, previo a la toma de sangre venosa. Adicionalmente se obtuvo un consentimiento informado de cada voluntario. Los individuos incluidos en este estudio han debido fumar al menos 5 tabacos diarios. Es importante recalcar que el estudio no se basa en los fumadores, sino en las células sanguíneas de personas fumadoras como modelo *in vitro*, las cuales que presentan un estrés oxidativo inducido por el hábito de fumar.

Tabla 1.

Características de los sujetos de estudio

FUMADORES					NO FUMADORES		
Código	Sexo	Edad	Tabaco/día	Años	Código	Sexo	Edad
F001	M	45	12	27	NF001	F	30
F002	M	35	15	18	NF002	M	33
F003	F	44	12	24	NF003	M	25
F004	F	33	6	15	NF004	M	37
F005	M	36	5	16	NF005	F	31
F006	F	24	5	1	NF006	M	35
F007	F	31	5	11	NF007	F	32
F008	M	26	10	1	NF008	M	23
F009	M	25	5	5	NF009	F	24
F010	F	23	5	1	NF010	M	36
F011	M	23	7	7	NF011	M	25
F012	M	26	10	7	NF012	M	27
F013	M	31	3	12	NF013	F	41
F014	F	22	5	3	NF014	F	23
F015	F	20	4	5	NF015	F	43
F016	M	33	3	5	NF016	F	25

F017	M	N/A	N/A	N/A	NF017	M	21
F018	M	23	5	5	NF018	F	23
F019	M	26	6	10	NF019	M	38
F020	M	20	5	3	NF020	M	38

Nota: ^a El individuo F017 no concluyó el experimento.

4.2. Preparación del cultivo *in vitro*

El procedimiento del cultivo se realizó en base al protocolo descrito por Baserga, el cual consiste en un macrocultivo de linfocitos. La muestra de sangre de las personas fumadoras y no fumadoras se colocó en un tubo con heparina y se verificó que la sangre se encuentre totalmente cubierta con el anticoagulante de tal forma que preserve la calidad de la muestra. El material recolectado fue llevado inmediatamente a una cámara de flujo laminar de marca Thermo Fisher Scientific, la cual se encontraba previamente esterilizada. De igual manera se elaboró previamente el medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco™), el cual fue suplementado según se observa en la tabla 2, (Baserga, 1989).

Tabla 2.

Composición del medio de cultivo

Medio RPMI 1640 (Gibco™)	100 ml
Fitoheماغلوتينina (Gibco™)	10ml
Suero Fetal Bovino (Gibco™)	20ml
Antibiótico Antimicótico (Gibco™)	1,5 ml
HEPES Buffer (Gibco™)	1,5 ml

L- Glutamina 200Mm (Gibco™)	0,5 ml
--	--------

Inmediatamente se realizó el tratamiento control en el cual se colocó 4ml de medio preparado con 1ml de sangre en un tubo Falcon™ de 15ml, mientras que para los otros tratamientos se pesó 1mg/tratamiento de horchata liofilizada y se resuspendió en 1 ml de medio RPMI 1640 previamente preparado, el cual se pasó por un filtro de membrana con un tamaño de poro de 0,22 μm (ipPORE™) para evitar cualquier tipo de contaminación bacteriana. En el primer tratamiento de estudio se colocó 3600 μl de medio y 400 μl de extracto liofilizado de horchata (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en el segundo tratamiento se utilizó 3500 μl de medio y 500 μl de extracto (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), finalmente a ambos se les agregó 1 ml de sangre. Con una ligera inversión se procuró que la muestra quedara totalmente inmersa. Finalmente los tubos cultivados se incubaron por 72 horas a 37°C (Termo Fisher Scientific) (Ramos et al., 2014).

4.3. Procesamientos de cultivos

4.4.1. Análisis citogenético

Para este procedimiento se utilizó el protocolo descrito por Baserga, previo al proceso se colocó 200 μl de colchicina (KaryoMAX™) en todos los tratamientos cultivados y se incubaron por una hora a 37 °C. Una vez pasado el tiempo de incubación los tratamientos fueron centrifugados (Hettich zentrifugen), para obtener el botón celular que fue el material de partida. Posteriormente se eliminó el sobrenadante en su gran mayoría y con la ayuda de una pipeta se homogenizaron las células, cada tubo se sometió a una solución hipotónica con KCL al 0,54% e inmediatamente se incubó en el baño maría a 37°C durante un periodo de 25 minutos, esto permitió la expansión de las células. La fijación de las células se obtuvo con la solución de Carnoy compuesta de metanol y ácido

acético en proporción 3:1, este último procedimiento se repitió por 4 veces y se refrigeró por cuatro horas mínimo (Baserga, 1989).

A continuación, se realizó la extensión de las muestras en placas portaobjetos debidamente rotuladas, en cada una se colocó 18 gotas de la muestra y con la ayuda de una plancha de calentamiento se dejó secar para posteriormente teñir con giemsa (Merk KGaA) por 10 minutos.

4.4.2. Bando cromosómico

Las placas extendidas de cada tratamiento se dejaron reposar por 24 horas sin teñir, previo al proceso de bando. Se mezcló 45 ml de NaCl al 0.9% con 5ml de tripsina 0,25% (Gibco™), y se mantuvo a 37°C, antes del proceso de bando. Una vez alcanzada la temperatura deseada en dicha solución se realizó el tratamiento de las placas durante 13 segundos con la solución de tripsina y posteriormente se lavó las placas en NaCl al 0,9% para finalizar la acción de la enzima. Para la tinción se utilizó una solución de 5ml de Giemsa con 45ml de agua destilada durante cuatro minutos. El cariotipo fue analizado en el microscopio Olympus BX51.

4.4.3. Diseño experimental

El presente estudio planteó el análisis del efecto de una infusión de plantas medicinales y aromáticas en los linfocitos de personas fumadoras *in vitro*. Para ello se estableció un análisis de tratamientos con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, basada en esta se pudo analizar el efecto de la infusión de horchata en el daño provocado a los cromosomas por el estrés inducido en células sanguíneas de personas fumadoras. Se tomó en cuenta tres ensayos que se realizaron en macrocultivos suplementados con la infusión y el ensayo

control que es un medio de cultivo sin la misma. Así mismo se analizó la población control que son aquellas personas libres de tabaco. Esto permitió plantear la prueba no paramétrica para muestras independientes en donde se determinó si existe o no una relación entre la variable de respuesta y el factor de estudio. Siendo la variable de respuesta la frecuencia de aberraciones cromosómicas y el factor de estudio el posible efecto antigenotóxico de la horchata. Así se estableció si la infusión de horchata tuvo alguna influencia positiva en los linfocitos ya sea de personas fumadoras o no fumadoras., esto fue realizado mediante el software SPSS (Bausela Herreras & Mide Petra, 2005).

4.4.4. Evaluación estadística de los resultados

El conteo y análisis cromosómico se realizó mediante el software CytoVision, se analizaron este permitió ver como mínimo 50 metafases por tratamiento en cada individuo para la determinación de frecuencia de AC. Una vez planteada la frecuencia, la significancia de cada resultado se estableció por medio de la prueba de U de Mann-Whitney en torno al análisis de las dos poblaciones que mide incidencia de AC en los individuos control y de estudio. Así también se analizó con el coeficiente de correlación de Pearson la posible correlación de las características de individuos fumadores con el porcentaje de AC. Finalmente se estableció si la diferencia entre los tratamientos es significativa para determinar el efecto antigenotóxico, estudiando las tablas generadas por SPSS con la prueba de Kruskal- Wallis que permitió establecer si dentro de los ensayos alguno tuvo mayor relevancia en torno a la variable de respuesta.

5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5. Análisis de resultados de los fumadores

Se analizó un total de 39 sujetos que consistió de 19 fumadores y 20 no fumadores. De los voluntarios fumadores el 89,4% tienen entre los 20 y 35 años, únicamente el 10,52% de ellos llegan a los 45 años; la media de tabacos es de 7 por día con un tiempo promedio de consumo de 5 años. Los no fumadores en cambio se utilizan como un control de análisis basado en una población libre de tabaco.

El test de aberraciones cromosómicas permite evaluar los efectos genotóxicos que podrían ocasionarse por el consumo de tabaco, estos resultados se pueden observar en la tabla 3. El ensayo se repitió en los 19 voluntarios y basado en la estadística se pudo determinar una correlación muy baja de la edad, el número de tabacos y los años que llevan fumando con el porcentaje de aberraciones cromosómicas, esto de acuerdo al nivel de significancia que fue de 0,631, 0,954 y 0,487 respectivamente, todos mayores a 0,005. Otras investigaciones, realizadas por Sierra y sus colaboradores encontraron una correlación positiva entre la frecuencia de aberraciones cromosómicas y la intensidad que tienen con el hábito de fumar (Sierra, Arboleda, Hoyos, & Sierra, 2004). De igual manera, en un estudio realizado con fumadores pasivos se logró determinar que existe una correlación entre los niveles de cotinina con la frecuencia de aberraciones cromosómicas, lo cual podría significar que también se relacione con el número de tabacos, ya que, a mayor cantidad se va a producir más cotinina en los desechos biológicos (Balachandar, Kumar, Suresh, & Sasikala, 2008).

En este trabajo la edad, el número de tabacos o los años que llevan fumando fueron variables independientes del número de aberraciones cromosómicas que se presentaron, esto puede deberse a una serie de factores en los que influye el estilo de vida de cada persona y que va a determinar si estas siguen una tendencia, además de esto el tamaño de la población pudo influir para poder establecer una relación de las características con los resultados

citogenéticos. Por otro lado, algunos estudios realizados por Haverić y otros autores han determinado que la intensidad y el número de años que las personas hayan fumado son factores importantes que van a influir en el daño del DNA (Haverić, Haverić, & Ibrulj, 2016). Como se mencionó antes, aunque la edad y el género no significaron factores relevantes para correlacionar con la frecuencia de aberraciones, se ha demostrado que la edad podría ser un factor crucial para la formación de aneuploidías o enfermedades ligadas al número de cromosomas (Dumanski et al., 2015; Haverić et al., 2016). Las alteraciones numéricas encontradas en esta investigación no se presentaron en una frecuencia significativa que permita relacionar con la ingesta del tabaco. Lo más probable es que se hayan producido por el procesamiento de las muestras (Haverić et al., 2016).

Tabla 3.

Frecuencia de aberraciones cromosómicas de los fumadores en función del consumo de tabaco

FUMADORES					
CÓDIGO	Sexo	Edad	Tabaco/día	Años	% AC
F001	M	45	12	27	6
F002	M	35	15	18	10
F003	F	44	12	24	10
F004	F	33	6	15	10
F005	M	36	5	16	6
F006	F	24	5	1	6
F007	F	31	5	11	4
F008	M	26	10	1	10
F009	M	25	5	5	6
F010	F	23	5	1	10
F011	M	23	7	7	8
F012	M	26	10	7	4
F013	M	31	3	12	4
F014	F	22	5	3	10
F015	F	20	4	5	6
F016	M	33	3	5	6
F018	M	23	5	5	10

F019	M	26	6	10	10
F020	M	20	5	3	8

5.6. Análisis de resultados entre fumadores y no fumadores

Los resultados del presente estudio confirmaron que los fumadores tienen una frecuencia más alta de aberraciones cromosómicas que los no fumadores esto basado en las diferencias estadísticas entre los tratamientos control de ambas poblaciones que se realizó con una prueba de U de Mann-Whitney, en el cual se obtuvo un rango promedio de 28.76 en la frecuencia de los fumadores frente a un 10,24 de los no fumadores (tabla 4). El estadígrafo fue de 4,500 y el valor $p < 0,05$ lo que indica diferencia entre los tratamientos, por ende, la frecuencia de aberraciones cromosómicas difiere entre fumadores y no fumadores (Martínez, 2018; Smalheiser & Smalheiser, 2017).

La incidencia de gaps y roturas se muestra en la tabla 5 y las ilustraciones en el anexo 7, en base al análisis citogenético se pudo notar que las aberraciones de tipo cromatídico son el tipo de aberraciones cromosómicas más frecuentes tanto en fumadores como en los no fumadores y las de tipo cromosómico se presentaron únicamente en el grupo de los fumadores (anexo 7 y 8). Esto se podría relacionar con el humo de cigarrillo que se introduce al cuerpo, el cual puede generar varias alteraciones en el estado normal de un ser humano, por lo tanto, reorganiza de alguna manera el material hereditario que provoca mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas (Reddy, Devi, Vidyullatha, Prasad, & Reddy, 2000). Los resultados son consistentes con los estudios reportados por Christobher y sus colaboradores, en donde se indica que las frecuencias de AC son mayores en el grupo expuesto al humo del tabaco y que por lo general predomina las aberraciones de tipo cromatídico. Por lo que, se ha demostrado que fumar genera un efecto considerable en la formación de

aberraciones cromosómicas de sujetos expuestos al tabaco (Christobher et al., 2017).

Investigaciones previas han analizado el efecto directo de la nicotina en las células llegando a determinar resultados similares que indican un aumento significativo de AC estructurales en comparación con el control negativo (Ginzkey et al., 2014). Cabe recalcar que, aunque todas las células tienen la capacidad de repararse muchas veces las lesiones que se producen por efectos genotóxicos no logran hacerlo correctamente (Natarajan & Palitti, 2008). Esto puede desencadenar una serie de efectos nocivos en el organismo que faciliten la formación de AC de tipo cromosómico y de cromátide que son indicadores predictores de generar cáncer, y que se han reportado en estudios de cohortes con linfocitos humanos (Hagmar et al., 1998; Norppa et al., 2006).

Tabla 4.

Frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas en las células sanguíneas de personas fumadoras y no fumadoras

Tratamiento	FUMADORES			NO FUMADORES		
	Tipo cromatídico	Tipo cromosómico	Total %AC	Tipo cromatídico	Tipo cromosómico	Total %AC
	Gap / roturas	Gap / roturas		Gap / roturas	Gap / roturas	
Control (0)	6,05%	0,60%	7,57 ± 2,30	2,6 %	N/A	2,6 ± 1

Nota: En el total de aberraciones cromosómicas se presenta la frecuencia de AC ± la desviación estándar.

Tabla 5.

Resultados estadísticos de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en ambas poblaciones, realizada con la prueba de U de Mann-Whitney

Rangos

Población		N	Rango promedio	Suma de rangos
Frecuencia_AC	Frecuencia_AC_Fumadores	19	28,76	546,50
	Frecuencia_AC_Nfumadores	19	10,24	194,50
	Total	38		

Estadísticos de prueba^a

	Frecuencia_A C
U de Mann-Whitney	4,500
W de Wilcoxon	194,500
→ Z	-5,390
Sig. asintótica (bilateral)	,000
Significación exacta [2* (sig. unilateral)]	,000 ^b

5.7. Análisis del efecto antígenotóxico de la horchata lojana

La investigación realizada entre los fumadores y no fumadores se estratificó en ensayos basados en cultivos con extracto en dos concentraciones y el ensayo control sin el mismo. El análisis estadístico para determinar el efecto de la horchata en los tres tratamientos se realizó a través de la prueba de Kruskal-Wallis que determinó que no existe diferencia significativa entre los tres tratamientos, con un valor p de 0,266 y 0,288 para los fumadores y no fumadores respectivamente (Anexos 5 y 9). Esto se puede observar gráficamente en la figura 13 en donde se ha tomado la mediana de cada ensayo con respecto a la formación de aberraciones cromosómicas, además se observan los valores de la frecuencia de AC \pm la desviación estándar de cada tratamiento en el anexo 10, lo que indica que en el análisis total de alteraciones estructurales no se presenta diferencia relevante. Estos resultados pueden deberse a que las alteraciones que se provocan en una persona por cualquier influencia genotóxica se producen en errores previos del DNA que se vuelven

irreversibles e irreparables y finalmente conduce a la carcinogénesis (Asaithamby et al., 2011; Tucker & Preston, 1996). Sin embargo, las células de un fumador acumulan o se someten a sustancias químicas que generan efectos de constante estrés oxidativo en las células, razón por la que se considera la formación de nuevas alteraciones *in vitro* y que podrían minimizar su desarrollo al estar presente un agente antioxidante o antiogénotóxico (Donohue, 2006; Isik, Ceylan, & Isik, 2007; Rao, Ande, Sinha, Kumar, & Kumar, 2016).

Como se mencionó anteriormente las aberraciones de tipo cromosómico se presentaron únicamente en los fumadores, lo cual podría estar relacionado con el estrés celular que presenta el fumador al haberse sometido por mucho tiempo al tabaco (Isik et al., 2007). Las aberraciones de tipo cromátide se dan en la fase G2 de la mitosis cuando el DNA post-sintético ha sido sometido a cualquier efecto de alguna sustancia mutagénica o genotóxica que impide su formación normal y provoca el cambio estructural del brazo de un solo cromosoma. En cambio las aberraciones del cromosoma se forman en la mitosis en la fase G1 cuando se está formando el DNA pre-sintético e involucran ambas cromátidas (Revell, 1974). Cabe recalcar que, las aberraciones cromosómicas que alteran ambas cromátidas se presentaron en menor cantidad en los tratamientos con horchata y fueron más frecuentes en el control de las personas fumadoras, esto se puede observar en la figura 14, que señala la suma de alteraciones totales de la población de estudio y que indica una notable disminución de AC que implicaría un posible efecto antigenotóxico de la horchata. Esto puede deberse a que *in vitro* se esté generando una interacción con los agentes genotóxicos del tabaco, permitiendo darles estabilidad a las células y protegerlas contra el daño cromosómico mediado por el estrés oxidativo.

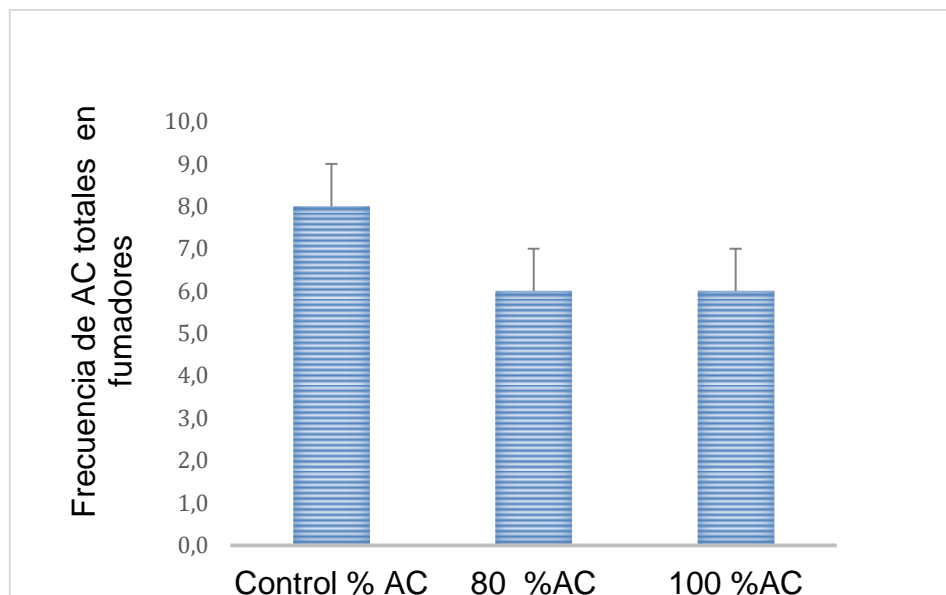


Figura 15. Mediana de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en personas fumadoras con el extracto liofilizado de horchata y sin el mismo.

Nota: Las barras de error se refieren a la variabilidad biológica representada como error típico.

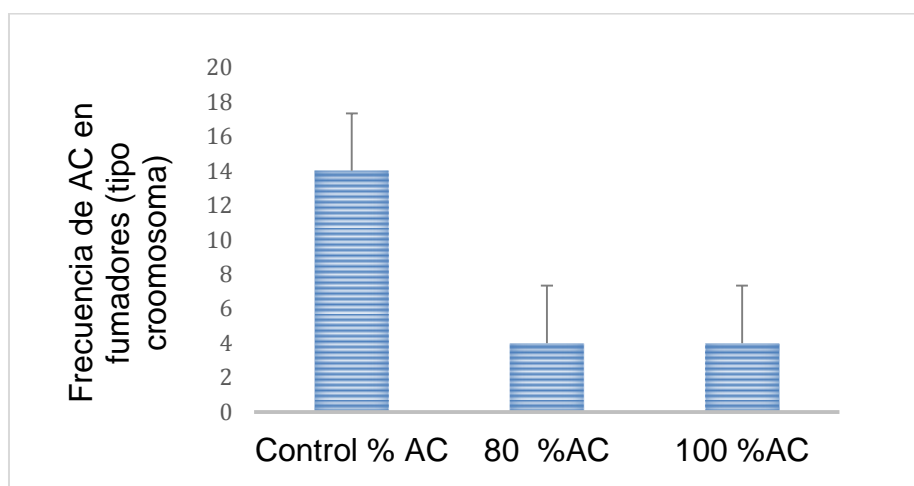


Figura 16. Sumatoria de la frecuencia de aberraciones de cromosoma que se presentaron en personas fumadoras con el extracto liofilizado de horchata y sin el mismo.

Nota: Las barras de error se refieren a la variabilidad biológica representada como desviación estándar.

Hasta donde se ha investigado no se han encontrado estudios que relacionen el extracto de horchata lojana como una posible bebida antígenotóxica en personas que consumen tabaco basado en un estudio a nivel cromosómico. Sin embargo, si se han tratado células de cáncer en donde se trabajó con la horchata para medir el efecto genotóxico a través de un ensayo de micronúcleos que determinó una disminución en el daño al DNA (Bailon et al., 2017). En esta investigación es probable que se necesite un número de muestra más grande que siga un patrón en la población de tal forma que permita analizar un mismo resultado en base al efecto genotóxico. Podría deberse también al análisis directo de un modelo celular en el cual es probable que sea más evidente la acción de la horchata, ya que, si la investigación es realizada en células sanas sometidas directamente a un agente tóxico como el HgCl_2 , de alguna manera provocan un daño más evidente lo que permitiría evidenciar la acción de un agente genotóxico y su posible antígenotóxico. Es así como se podría determinar la acción *in vitro* que se produce al generar una estabilidad celular como lo hicieron Patel y Rao en su investigación, determinando una óptima actividad de la melatonina como antígenotóxico comercial que impide la formación de aberraciones cromosómicas en células expuestas al metales pesado (Patel & Rao, 2018).

5.8. Análisis de bandas en las poblaciones de estudio

En el anexo 8 se puede observar algunas imágenes de los cariotipos analizados con bandeado GTG de los voluntarios. En esta se puede observar la diferenciación y caracterización citogenética de los cromosomas de cada individuo lo cual determinó que todos presentaron un cariotipo normal, sin la presencia de algún otro factor o alteración cromosómica de tipo clínico (Huang & Chen, 2017; Miller & Therman, 2001) . Esto tienen sentido ya que la mayoría

de las personas que forman parte de esta investigación no presentan ningún tipo de enfermedades genética heredada a sí misma.

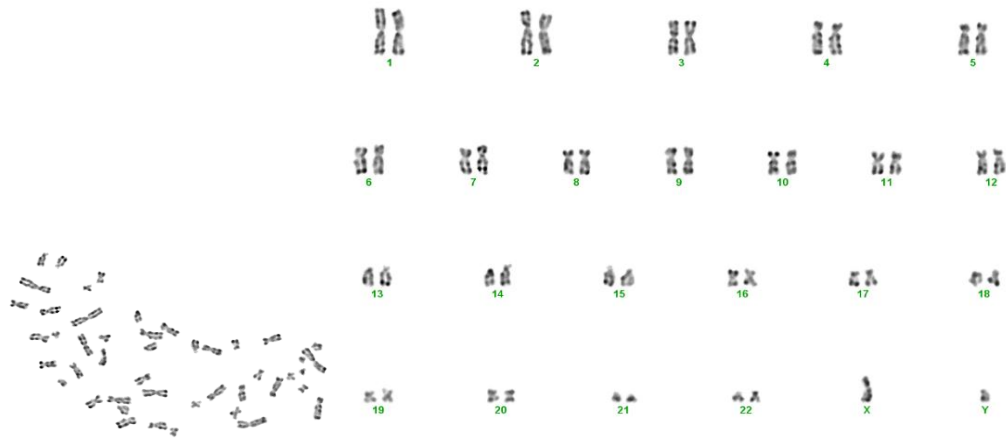


Figura 17. Metafase y cariotipo normal de un individuo masculino fumador. Imágenes obtenidas por la autora microscópicamente en el software CytoVision.

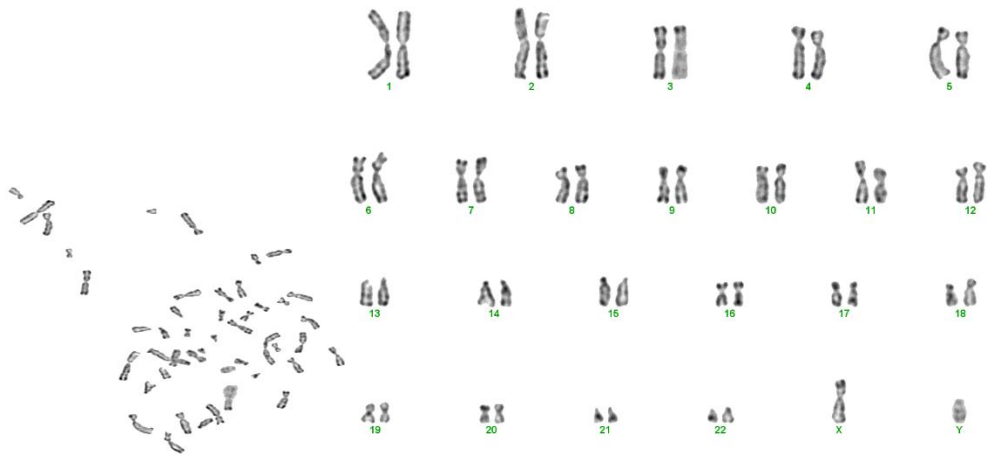


Figura 18. Metafase y cariotipo normal de un individuo masculino fumador. Imágenes obtenidas por la autora microscópicamente en el software CytoVision.

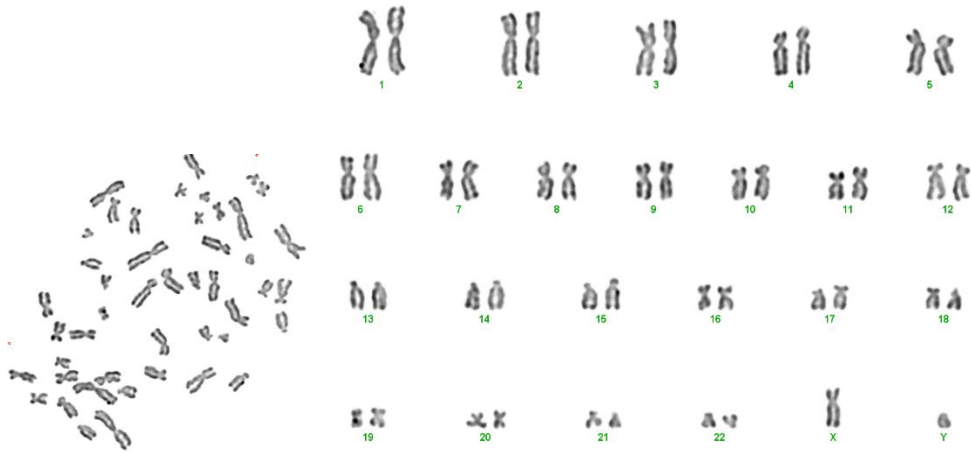


Figura 19. Metafase y cariotipo normal de un individuo masculino no fumador. Imágenes obtenidas por la autora microscópicamente en el software CytoVision.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Dados los resultados obtenidos en la presente investigación se puede afirmar que no existe una correlación positiva en torno a la formación de alteraciones cromosómicas en las personas fumadoras frente a las características de cada individuo. Lo cual resulta contradictorio con otros resultados basados en otras investigaciones, sin embargo, es importante recalcar que dichos resultados pueden verse influidos por el tamaño de la muestra. Además de ello se puede afirmar que la incidencia de gaps y roturas fue mayor en la población que consume tabaco con una significancia $p > 0,05$ menor a la establecida en el estadístico de U Mann Whitney, esto nos señala que existe una diferencia relevante entre los controles de estudio de ambas poblaciones, lo cual, muestra los posibles efectos genotóxicos que puede estar desencadenado en el sistema biológico de cada voluntario expuesto al tabaco. Esto de alguna manera está provocando cambios irreversibles en el DNA ya que las AC son conocidas como los puntos intermedios antes de presentarse la carcinogénesis. De esta manera se confirma el efecto clastogénico del tabaco.

Finalmente se logró determinar el efecto que está desencadenado la horchata liofilizada a nivel celular, determinando el análisis de aberraciones preexistentes y las que se formen en el cultivo por el constante estrés celular de una persona fumadora. De tal forma que se presenta un porcentaje de alteraciones estructurales que disminuyen su formación en los ensayos con horchata, por lo que probablemente se establezca el estrés oxidativo ocasionado en las células. Es decir que, no logra reparar las que se formaron con anterioridad, pero es probable que si disminuya la formación de nuevas alteraciones cromosómicas. Donde el extracto juega un papel crucial como una mezcla con actividad biológica útil para evitar daños provocados por agentes genotóxicos. Es decir que esta investigación otorga información novedosa

como base de futuros estudios tanto a nivel celular, así como también en modelos *in vivo*.

6.2. Recomendaciones

Para futuros estudios se recomienda utilizar una mayor cantidad de voluntarios ya que esto podría generar una correlación positiva entre las características de los individuos de estudio y la frecuencia de AC, y mejorará la congruencia de los datos.

Otra forma de mejorar la precisión en la investigación es utilizando una exposición directa del agente genotóxico sobre las células sanas de personas no fumadoras ni expuestas a ningún agente mutagénico, esto debido a que, el efecto sería aún más dañino y es probable que la acción de la horchata se pueda medir en mayor cantidad por lo que tendrá un mayor soporte el uso de esta bebida como una mezcla antioxidante.

Para demostrar la eficacia de cualquier alimento, planta o fruto como un antioxidante o antiogenotóxico es fundamental que esta investigación sea realizada *in vivo* con el fin de comprobar que los resultados del modelo *in vitro* no difieren uno del otro.

Adicionalmente, es fundamental que se complemente con el análisis de otros parámetros a través de pruebas bioquímicas, con el objetivo de obtener resultados más integrales y completos.

7. REFERENCIAS

- Acosta, I., Remón, L., Segura, R., Ramírez, G., Carralero, A. (2016). Factores de riesgo en el cáncer de pulmón. *Correo Científico Médico*, 20(1), 42–55. Recuperado el 8 de noviembre de 2018 de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812016000100005
- Aguilar, R., Cabrera, F., Iturbide, D., Zaldívar, Molina, E. (2013). *Enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of minimally processed cactus stems (Opuntia ficus-indica Mill.) packaged under modified atmospheres. International Journal of Food Science & Technology*, 48(12), 2603–2612. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12256>
- Aires, A., Carvalho, R., Saavedra, M. J. (2016). *Valorization of solid wastes from chestnut industry processing: Extraction and optimization of polyphenols, tannins and ellagitannins and its potential for adhesives, cosmetic and pharmaceutical industry. Waste Management*, 48, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2015.11.019>
- Almeida. (2018). *Obtención de aminoácidos libres a partir de quinua orgánica (Chenopodium quinoa) por hidrólisis y su aplicación en un suplemento alimenticio*. Ambato. Recuperado el 17 de enero del 2019 de <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/28232/1/04 T.AL.pdf>
- Arboleda, Y., Hoyos, L., Carvajal, S., Sierra, C. (2004). Genotoxicidad por exposición a cigarrillos en fumadores jóvenes en Colombia. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* (Vol. 15). Recuperado el 13 de diciembre del 2018 de https://www.scielosp.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/rpsp/v15n6/22167.pdf
- Arboleda, Y., Hoyos, L., Carvajal, S., & Sierra, H. (2001). *Acta biológica Colombiana. Acta Biológica Colombiana* (Vol. 6). Retrieved from <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/26444>
- Asaithamby, A., Hu, B., Delgado, O., Ding, L.-H., Story, M. D., Minna, J. D., ...

- Chen, D. J. (2011). *Irreparable complex DNA double-strand breaks induce chromosome breakage in organotypic three-dimensional human lung epithelial cell culture*. *Nucleic Acids Research*, 39(13), 5474–5488. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr149>
- Asensi-Fabado, M. A., & Munné-Bosch, S. (2010a). *Vitamins in plants: occurrence, biosynthesis and antioxidant function*. *Trends in Plant Science*, 15(10), 582–592. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2010.07.003>
- Asgary, S., Naderi, G., & Ghannady, A. (2005). *Effects of cigarette smoke, nicotine and cotinine on red blood cell hemolysis and their -SH capacity*. *Experimental and Clinical Cardiology*, 10(2), 116–119. Recuperado el 5 de diciembre de 2018 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19641671>
- Ayarde.B, Cuti.M, Ascarrunz.M, T. . (2008). Efecto genotóxico del consumo de tabaco en estudiantes de la Facultad de Medicina de la UMSA que habitan en la altura. Recuperado el 15 de febrero de 2019 de <http://www.scielo.org.bo/pdf/rbfb/v16n1/v16n1a12.pdf>
- Baiano, & Del Nobile. (2016). Antioxidant Compounds from Vegetable Matrices: Biosynthesis, Occurrence, and Extraction Systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(12), 2053–2068. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.812059>
- Bailon-Moscoso, N., Tinitana, F., Martínez-Espinosa, R., Jaramillo-Velez, A., Palacio-Arpi, A., Aguilar-Hernandez, J., & Romero-Benavides, J. C. (2017). *Cytotoxic, antioxidative, genotoxic and antigenotoxic effects of Horchata, beverage of South Ecuador*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 539. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2048-x>
- Balachandar, V., Kumar, B. L., Suresh, K., & Sasikala, K. (2008). *Evaluation of Chromosome Aberrations in Subjects Exposed to Environmental Tobacco Smoke in Tamilnadu, India*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(3), 270–276. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9489-3>
- Baserga, R. (1989). *Cell growth and division : a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press. Recuperado el 10 de diciembre de 2018 de <https://books.google.com.ec/books?id=Tt3GQgAACAAJ&dq=baserga+rena to+cell+growth+and+division&hl=es->

- 419&sa=X&ved=0ahUKEwjs8YHh5pbfAhUo11kKHbcsB7sQ6AEIODAC
- Bausela Herreras, E., & Mide Petra, Á. (2005). SPSS: Un instrumento de análisis de datos cuantitativos. *Revista de Informática Educativa y Medios Audiovisuales*, 2(4), 62–69. Recuperado el 20 de enero de 2019 de <http://laboratorios.fi.uba.ar/lie/Revista/Articulos/020204/A3mar2005.pdf>
- Beck, A. L., Fernandez, A., Rojina, J., & Cabana, M. (2017). *Randomized Controlled Trial of a Clinic-Based Intervention to Promote Healthy Beverage Consumption Among Latino Children. Clinical Pediatrics*, 56(9), 838–844. <https://doi.org/10.1177/0009922817709796>
- Behrend, C., Karimzad, J., Mehdipour, H. P., & Schwanitz, G. (2017). *Human Chromosome Atlas Introduction to Diagnostics of Structural Aberrations*. Recuperado el 5 de mayo de 2019 de <https://link-springer-com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-54099-3.pdf>
- Benowitz, N. L., Hukkanen, J., Jacob, P., & III. (2009). *Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. Handbook of Experimental Pharmacology*, (192), 29–60. https://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5_2
- Bhat, T. A., & Wani, A. A. (Eds.). (2017). *Chromosome Structure and Aberrations*. New Delhi: Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3673-3>
- Bhattachar, S. (2011). Natural Antimutagens: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5(2), 116–126. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2011.116.126>
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). *Oxidative stress and antioxidant defense. The World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9–19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S., & Pfander, H. (2012). *Carotenoides: manual*. Recuperado el 21 de abril de 2019 de https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=EFj2BwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR7&ots=9_QlwQ6_u_&sig=XoG8oINU5a6UuGb2k7zogBTvE1c
- Buchhaupt, M., Kähne, F., Etschmann, M. M. W., & Schrader, J. (2014). *Biotechnological Production of. Flavour Science*, (January 2006), 195–200. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398549-1.00037-4>

- Carranco, Calvo, P. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión (Vol. 61). Recuperado el 21 de abril de 2019 de <http://www.scielo.org.ve/pdf/alan/v61n3/art01.pdf>
- Castro, Gutiérrez, Acuña, Cerderia, Pacaya, Gutiérrez, Tapullima, Cobos, I. (2013). *variation of vitamina c and antocianins in myrciaria dubia "camu camu"*; *rev soc quím perú* (Vol. 79). Recuperado el 19 de abril de 2019 de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v79n4/a04v79n4.pdf>
- Christobher, S., Periyasamy, M., Syed Mohamed, H. E., Sadiq Bukhari, A., Karthickkumar, A., & Balachandar, V. (2017). *Cytogenetical analysis in blood lymphocytes of cigarette smokers in Tiruchirappalli district, Tamil Nadu, India*. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 18(2), 147–152. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2016.05.003>
- Cortés-Gutiérrez, E. I., Dávila-Rodríguez, M. I., Fernández, J. L., López-Fernández, C., Gosálbez, A., & Gosálvez, J. (2011). *New application of the comet assay: chromosome--comet assay*. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 59(7), 655–660. <https://doi.org/10.1369/0022155411410884>
- de Almeida, T. S., Neto, J. J. L., de Sousa, N. M., Pessoa, I. P., Vieira, L. R., de Medeiros, J. L., ... Carvalho, A. F. U. (2017). *Phenolic compounds of Triplaris gardneriana can protect cells against oxidative stress and restore oxidative balance*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 1261–1268. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.050>
- De Castro, O., Gargiulo, R., Del Guacchio, E., Caputo, P., & De Luca, P. (2015). *A molecular survey concerning the origin of Cyperus esculentus (Cyperaceae, Poales): two sides of the same coin (weed vs. crop)*. *Annals of Botany*, 115(5), 733–745. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv001>
- Donohue, J. F. (2006). *Ageing, smoking and oxidative stress*. *Thorax*, 61(6), 461–462. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.053058>
- Drope, Schluger, Cahn, Drope, Hamill, Islami, Liber, Nargis, S. (2018). *The Tobacco Atlas*. Atlanta: American Cancer Society and Vital Strategies (Sixth edition). Recuperado el 14 de abril de 2019 de www.tobaccoatlas.org

- Dumanski, J. P., Rasi, C., Lönn, M., Davies, H., Ingelsson, M., Giedraitis, V., ... Forsberg, L. A. (2015). *Smoking is associated with mosaic loss of chromosome Y*. *Science*, 347(6217), 81–83. <https://doi.org/10.1126/science.1262092>
- Eastmond, D. A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W. A., Cimino, M. C., Dobrev, I., ... Vickers, C. (2009). *Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme*. *Mutagenesis*, 24(4), 341–349. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb014>
- Escribano, G., Castillo, S., Daher, V., Salazar, S., Tobella, L. (2009). Principales factores que producen fragilidad cromosómica transitoria en los pacientes referidos para estudio citogenético. Recuperado el 10 de diciembre de 2018 de www.redclinica.cl
- Evans, H. J., & O’Riordan, M. L. (1975). *Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests*. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 31(3), 135–148. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90082-5](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90082-5)
- Feliu, E. (2001). *Esquemas clínico-visuales en hematología*. Harcourt.
- Fiedor, J., & Burda, K. (2014). *Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease*. *Nutrients*, 6(2), 466–488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>
- Fleck, M., & Petrosyan, A. M. (2014). *Salts of amino acids: crystallization, structure and properties*.
- García, Villamizar, Núñez, Ocazonez, Stashenko, F. (2019). *Photoprotective and Antigenotoxic Effects of the Flavonoids Apigenin, Naringenin and Pinocembrin*. *Photochemistry and Photobiology*. <https://doi.org/10.1111/php.13085>
- Ginzkey, C., Steussloff, G., Koehler, C., Burghartz, M., Scherzed, A., Hackenberg, S., ... Kleinsasser, N. H. (2014). *Nicotine derived genotoxic effects in human primary parotid gland cells as assessed in vitro by comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and chromosome aberrations test*. *Toxicology in Vitro*, 28(5), 838–846. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.03.012>

- González-Pumariega, M., Fuentes-León, F., Vernhes, M., Schuch, A. P., Martins Menck, C. F., & Sánchez-Lamar, Á. (2016). El extracto acuoso de *Cymbopogon citratus* protege al ADN plasmídico del daño inducido por radiación UVC. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 57(4), 193–199. <https://doi.org/10.4321/s2340-98942016000300002>
- Guimarães, A. P. A., Guimarães, A. C., Alcântara, D. Á., Cunha, L. R., Lima, P. L., Vasconcellos, M. C., ... Burbano, R. R. (2014). *Chromosomal Aberration Test Utilities In Vitro and In Vivo* (pp. 115–139). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1068-7_7
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brøgger, A., Knudsen, L. E., Norppa, H., & Reuterwall, C. (1998). *Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH)*. *Cancer Research*, 58(18), 4117–4121. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751622>
- Hale, J. P., Winlove, C. P., & Petrov, P. G. (2011). *Effect of hydroperoxides on red blood cell membrane mechanical properties*. *Biophysical Journal*, 101(8), 1921–1929. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.08.053>
- Häusler, R. E., Ludewig, F., & Krueger, S. (2014). *Amino acids – A life between metabolism and signaling*. *Plant Science*, 229, 225–237. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.09.011>
- Haverić, A., Haverić, S., & Ibrulj, S. (2016). *Chromosome aberrations frequency in peripheral blood lymphocytes in young tobacco smoking and non-smoking people*. *Journal of Health Sciences*, 6(2), 121–127. <https://doi.org/10.17532/jhsci.2016.368>
- Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araújo, W. L., & Braun, H.-P. (2015). *Amino Acid Catabolism in Plants*. *Molecular Plant*, 8(11), 1563–1579. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>
- Howes, M.-J. R. (2018). *Phytochemicals as Anti-inflammatory Nutraceuticals and Phytopharmaceuticals*. In *Immunity and Inflammation in Health and Disease* (pp. 363–388). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805417-8.00028-7>
- Huang, H., & Chen, J. (2017). *Chromosome Bandings*. In *Methods in molecular*

- biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 1541, pp. 59–66). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6703-2_6
- INEC. (2017). Camas y Egresos Hospitalarios |. Recuperado el 12 de junio de 2019 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/camas-y-egresos-hospitalarios/>
- International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature.*, Shaffer, L. G., & Tommerup, N. (2005). *ISCN 2005: an international system for human cytogenetic nomenclature (2005): recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. Karger.
- Isik, B., Ceylan, A., & Isik, R. (2007). *Oxidative Stress in Smokers and Non-smokers. Inhalation Toxicology*, 19(9), 767–769. <https://doi.org/10.1080/08958370701401418>
- Izquierdo-Vega, J. A., Morales, J. A., Sánchez, M., Betanzos-Cabrera, G., Sosa-Delgado, S. M., Sumaya-Martínez, M. T., ... Madrigal-Santillán, E. (2017a). *Evidence of Some Natural Products with Antigenotoxic Effects. Part 1: Fruits and Polysaccharides. Nutrients*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/nu9020102>
- Kasote, D. M., Katyare, S. S., Hegde, M. V, & Bae, H. (2015). *Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. International Journal of Biological Sciences*, 11(8), 982–991. <https://doi.org/10.7150/ijbs.12096>
- Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T., & Lim, S. M. (2017). *Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. Food & Nutrition Research*, 61(1), 1361779. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., ... Bolton, E. E. (2019). *PubChem 2019 update: improved access to chemical data. Nucleic Acids Research*, 47(D1), D1102–D1109. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>
- Leite-Silva, C., Gusmão, C. L. S., & Takahashi, C. S. (2007). *Genotoxic and antigenotoxic effects of Fucus vesiculosus extract on cultured human lymphocytes using the chromosome aberration and Comet assays.*

- Genetics and Molecular Biology*, 30(1), 105–111.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572007000100019>
- Levitt, S. H., Purdy, J. A., Perez, C. A., & Poortmans, P. (2012). *Technical basis of radiation therapy: practical clinical applications*. Springer. Recuperado el 5 de mayo de 2019 de https://books.google.com.ec/books?id=BafkJTTRdYwC&dq=dicentric+aberrations+chromosome&source=gbs_book_similarbooks
- Llambí, S., & Núñez, R. (2007). Identificación de fragilidad cromosómica mediante 5'azacitidina en linfocitos de bovinos. *Med. Vet.* 39, N° (Vol. 63). Retrieved from www.epigenome.org
- Llimpe, Y. (2007). Alteraciones citogenéticas en Leucemia Mieloide Aguda M2 (FAB) en adultos y su correlación con inmunofenotipo y morfología. Recuoerado el 16 de junio del 2019 de https://www.researchgate.net/publication/312057706_Alteraciones_citogeneticas_en_Leucemia_Mieloide_Aguda_M2_FAB_en_adultos_y_su_correlacion_con_inmunofenotipo_y_morfologia
- López,Santacruz,Navarro,Sotelo, G. (2015). A ^1H NMR Investigation of the Interaction between Phenolic Acids Found in Mango (*Manguifera indica* cv *Ataulfo*) and Papaya (*Carica papaya* cv *Maradol*) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) Free Radicals. *PloS One*, 10(11), e0140242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140242>
- Mahmoudi, S., Khali, M., Benkhaled, A., Benamirouche, K., & Baiti, I. (2016). *Phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of leaf extracts from ten Algerian Ficus carica L. varieties*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(3), 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.010>
- Maier, M., Oelbermann, A., Renner, M., & Weidner, E. (2017). Screening of European medicinal herbs on their tannin content — New potential tanning agents for the leather industry. *Industrial Crops & Products*, 99, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.01.033>
- Martínes & Martínez de Victoria. (2006). Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral. Nutrición

- Hospitalaria (Vol. 21). Jarpyo Editores. Recuperado el 20 de abril de 2019 de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112006000500002
- Martínez, P. (2018). "efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Piper aduncum* (matico) sobre cepa de *Porphyromona gingivalis* estudio *in vitro*. Recuperado el 26 de mayo de 2019 de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/14140/1/T-UCE-015-855-2018.pdf>
- Masilamani, V., AlZahrani, K., Devanesan, S., AlQahtani, H., & AlSalhi, M. S. (2016). *Smoking Induced Hemolysis: Spectral and microscopic investigations. Scientific Reports*, 6(1), 21095. <https://doi.org/10.1038/srep21095>
- McParland, B. J. (2010). *Nuclear medicine radiation dosimetry: advanced theoretical principles*. Springer.
- Mehta, A. J., Cassidy, A., Litonjua, A. A., Sparrow, D., Vokonas, P., & Schwartz, J. (2016). *Dietary anthocyanin intake and age-related decline in lung function: longitudinal findings from the VA Normative Aging Study. The American Journal of Clinical Nutrition*, 103(2), 542. <https://doi.org/10.3945/AJCN.115.121467>
- Melendez, A. J., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2004). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 54(2), 149–154.
- Miller, J., & Therman, E. (2001a). *Chromosome Bands. In Human Chromosomes* (pp. 79–94). New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0139-4_6
- Montes, D., De la Ossa, J. V, & Pérez-Cordero, A. (2017). *Comet assay to determine genetic damage by the use of ivermectin in zebu cows (Bos taurus indicus). Rev.MVZ Córdoba*, 22(2), 5959–5965. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1034>
- Moscoso, N., Tinitana, F., Espinosa, R., Jaramillo, A., Palacios, A., & Aguilar, J. (2017). *Cytotoxic, antioxidative, genotoxic and antigenotoxic effects of Horchata, beverage of South Ecuador. BMC Complementary and*

- Alternative Medicine*, 17(1), 539. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2048-x>
- Nai, G. A., Oliveira, M. C. de, Tavares, G. de O., Pereira, L. F. F., Soares, N. D. S. L., & Silva, P. G. (2015). Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. *Brazilian Journal of Anesthesiology (Edición En Español)*, 65(1), 21–26. <https://doi.org/10.1016/J.BJANES.2013.07.008>
- Nakamura, T., Ishida, Y., Ainai, K., Nakamura, S., Shirata, S., Murayama, K., ... Sasaki, Y. F. (2015). *Genotoxicity-suppressing effect of aqueous extract of Connarus ruber cortex on cigarette smoke-induced micronuclei in mouse peripheral erythrocytes. Genes and Environment: The Official Journal of the Japanese Environmental Mutagen Society*, 37, 17. <https://doi.org/10.1186/s41021-015-0009-5>
- Nakilcioğlu, Hışıl, G. (2013). *Research on the phenolic compounds in Sarılop (Ficus carica L.) fig variety. Gidadernegi.Org*. Recuperado el 13 de abril del 2019 de <http://www.gidadernegi.org/TR/Genel/dg.ashx?DIL=1&BELGEANAH=5884&DOSYASIM=Volume38number5.pdf#page=13>
- Natarajan, A. T., & Palitti, F. (2008). *DNA repair and chromosomal alterations. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 657(1), 3–7. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.08.017>
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.-L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., ... Fucic, A. (2006). *Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1–2), 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.05.030>
- Olivas-Aguirre, F. J., Wall-Medrano, A., González-Aguilar, G. A., Alberto López-Díaz, J., Álvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., & Ramos-Jimenez, A. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutr Hosp*, 31(1), 55–66. <https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7699>
- OPS. (2013). OPS/OMS | Mortalidad por cáncer está decayendo en algunos

- países de las Américas, según nuevo informe de la OPS/OMS. Recuperado el 10 de abril de 2019 de https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9135:2013-cancer-mortality-declining-some-countries-americas-new-paho-who-report&Itemid=1926&lang=es
- Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., ... Levine, M. (2003). *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. Journal of the American College of Nutrition, 22*(1), 18–35. Recuperado el 3 de mayo de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12569111>
- Palozza, P., Simone, R., & Mele, M. C. (2008). *Interplay of carotenoids with cigarette smoking: implications in lung cancer. Current Medicinal Chemistry, 15*(9), 844–854. Recuperado el 21 de abril de 2019 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473794>
- Patel, T. A., & Rao, M. V. (2018). *Antigenotoxic effect of melatonin against mercuric chloride in human peripheral blood lymphocytes. Toxicology and Industrial Health, 34*(11), 778–786. <https://doi.org/10.1177/0748233718795747>
- Peñarrieta et al. (2014). *Phenolic compounds in food* †. *bolivian journal of chemistry* (Vol. 31).
- Peñarrieta, J. M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J. L., & Bravo, J. A. (2014). *Phenolic Compounds in Food. Bolivian Journal of Chemistry, 31*(312), 68–81. <https://doi.org/10.1007/s00394-008-2002-2>
- Peralta I., E., Villacrés, E., Mazón, N., Rivera M., M., & Subía G., C. (2008). El ataco, sangorache o amaranto negro (*Amaranthus hybridus L.*) en Ecuador. Recuperado el 9 de abril de 2019 de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2710>
- Provan, D., Baglin, T., Dokal, I., & Vos, J. de. (2017). *Manual de hematología clínica.*
- Ramos, M., Descailleaux, J., Velásquez, M., Huanca, W., Iannuzzi, L., & Perucatti, A. (2014). *Adaptation of the lymphocyte culture technique of alpacas and lamas for the analysis of sister chromatid exchange (sce). Rev*

- Inv Vet Perú*, 25(4), 461–467. <https://doi.org/10.15381/rivep.v25i4.10781>
- Rao, P., Ande, A., Sinha, N., Kumar, A., & Kumar, S. (2016). *Effects of Cigarette Smoke Condensate on Oxidative Stress, Apoptotic Cell Death, and HIV Replication in Human Monocytic Cells*. *PloS One*, 11(5), e0155791. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155791>
- Reddy, P., Devi, C. V. R., Vidyullatha, V., Prasad, M. H., & Reddy, P. P. (2000). *Chromosomal aberrations in smokers exposed to metallic dust in mint factory*. *Rev Biomed* (Vol. 11). Retrieved from <http://www.uady.mx/~biomedic/rb001121.pdf>
- Revell, S. H. (1974). *The Breakage-and-Reunion Theory and the Exchange Theory for Chromosomal Aberrations Induced by Ionizing Radiations: A Short History*. *Advances in Radiation Biology*, 4, 367–416. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-035404-7.50014-0>
- Rios, M., Tinitana, F., Jarrín-v, P., Donoso, N., & Romero-Benavides, J. C. (2017). *“Horchata” drink in Southern Ecuador: Medicinal plants and people’s wellbeing*. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0145-z>
- Rios, M., Tinitana, F., Jarrín-V, P., Donoso, N., & Romero-Benavides, J. C. (2017). *“Horchata” drink in Southern Ecuador: medicinal plants and people’s wellbeing*. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0145-z>
- Rodrigues, F., Pimentel, F. B., & Oliveira, M. B. P. P. (2015). *Olive by-products: Challenge application in cosmetic industry*. *Industrial Crops and Products*, 70, 116–124. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2015.03.027>
- Ruiz Ruiz, J. C., Betancur Ancona, D. A., & Segura Campos, M. R. (2014). *Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential*. *Nutricion Hospitalaria*, 29(4), 776–784. <https://doi.org/10.3305/nh.2014.29.4.7208>
- Rydberg, B., & Johanson, K. J. (1978). *Estimation of dna strand breaks in single mammalian cells. dna repair mechanisms*, 465–468. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-322650-1.50090-4>
- Sabahi, Z., Soltani, F., & Moein, M. (2018). *Insight into DNA protection ability of*

- medicinal herbs and potential mechanisms in hydrogen peroxide damages model. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 8(2), 120.*
<https://doi.org/10.4103/2221-1691.225616>
- Safavi, S., & Paulsson, K. (2017). *Near-haploid and low-hypodiploid acute lymphoblastic leukemia: two distinct subtypes with consistently poor prognosis. Blood, 129(4), 420–423.* <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-743765>
- Schreck, R. R., & Disteche, C. M. (2001). *Chromosome Banding Techniques. In Current Protocols in Human Genetics (Vol. Chapter 4, p. Unit4.2).* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
<https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0402s00>
- Sierra-Torres, M. S., Arboleda-Moreno, Y. Y., Hoyos, L. S., & Sierra-Torres, C. H. (2004). *Chromosome aberrations among cigarette smokers in Colombia. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 562(1–2), 67–75.* <https://doi.org/10.1016/J.MRGENTOX.2004.05.006>
- Sindicato Médico del Uruguay., M. E., & Fundación Universitaria de Ciencia. Oficina del Libro. (2002). *La Revista médica del Uruguay. Revista Médica del Uruguay (Vol. 18).* Sindicato Médico del Uruguay. Recuperado el 8 de junio de 2019 de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902002000200003
http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902002000200003
- Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., & Waszkielewicz, A. M. (2014). *Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. Journal of Applied Genetics, 55(2), 273–285.*
<https://doi.org/10.1007/s13353-014-0198-9>
- Smalheiser, N. R., & Smalheiser, N. R. (2017). *Nonparametric Tests. Data Literacy, 157–167.* <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811306-6.00012-9>
- Sureka, C. S., & Armpilia, C. (2017). *Radiation biology for medical physicists. CRC Press.* Recuperado el 14 de mayo de 2019 de <https://books.google.com.ec/books?id=hyE6DwAAQBAJ&pg=PT78&lpg=PT78&dq=Acentric+rings+These+are+paired+segments+of+chromatid+witho>

- ut+a+centromere+and+which+are+joined+to+give+a+ring.&source=bl&ots=-M0pVLdxfx&sig=ACfU3U1iYrXB2VBOBTifGJMB47GD6pzGCQ&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwjC2ozm5ZriAhVsRN8KHRDpDUQQ6AEwA3oECAkQAQ#v=onepage&q=Acentric rings These are paired segments of chromatid without a centromere and which are joined to give a ring.&f=false
- Swift, L. H., & Golsteyn, R. M. (2014). *Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. International Journal of Molecular Sciences, 15(3), 3403–3431.* <https://doi.org/10.3390/ijms15033403>
- Sytar, Hemmerich, Zivcak, Rauh, B. (2018). *Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. Saudi Journal of Biological Sciences, 25(4), 631–641.* <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2016.01.036>
- Tavares, F., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Figueirinha, A., Lopes, M. C., ... Batista, M. T. (2015). Cymbopogon citratus industrial waste as a potential source of bioactive compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(13), 2652–2659.* <https://doi.org/10.1002/jsfa.6999>
- Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). *An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. Journal of Ethnopharmacology, 111(1), 63–81.* <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2006.10.032>
- Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., de la Cruz Rot, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2016). *Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 12(1), 1–18.* <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>
- Torres, L. O., Osorio, K. O., Murillo, B. H., Duque, J. A., & Jaramillo, C. P. (2014). Efectos genotóxicos de los contaminantes ambientales, en peces de importancia comercial del río Magdalena, en el departamento del Tolima. *Revista Tumbaga, 1(9)*. Recuperado el 11 de mayo de 2019 de <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/645>
- Tubiana, M., Dutreix, J., & Wambersie, A. (2005). *Introduction to radiobiology* (segunda edición). Taylor & Francis.

- Tucker, J. D., & Preston, R. J. (1996). *Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment*. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 365(1–3), 147–159. [https://doi.org/10.1016/S0165-1110\(96\)90018-4](https://doi.org/10.1016/S0165-1110(96)90018-4)
- Tukun, A. B., Shaheen, N., Banu, C. P., Mohiduzzaman, M., Islam, S., & Begum, M. (2014). *Antioxidant capacity and total phenolic contents in hydrophilic extracts of selected Bangladeshi medicinal plants*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7, S568–S573. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60291-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60291-1)
- Wan, E. S., Qiu, W., Baccarelli, A., Carey, V. J., Bacherman, H., Rennard, S. I., ... DeMeo, D. L. (2012). *Cigarette smoking behaviors and time since quitting are associated with differential DNA methylation across the human genome*. *Human Molecular Genetics*, 21(13), 3073–3082. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddc135>
- Wan, L., & Jiang, J. G. (2018). *Protective effects of plant-derived flavonoids on hepatic injury*. *Journal of Functional Foods*, 44(December 2017), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.015>
- Wu, H.-C., Chen, H.-M., & Shiau, C.-Y. (2003). *Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*)*. *Food Research International*, 36(9–10), 949–957. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2)
- Xu, D.-P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., ... Li, H.-B. (2017). *Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources*. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1). <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>
- Ansoar, Y., Fontanetti, C., Silvia del, & Carmen Díaz-Lle. (2015). *Aplicaciones del Ensayo Cometa en Genética Ecotoxicológica*. *Ciencias Biológicas*, 46(1), 51–62. Recuperado el 28 de abril de 2019 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181238817005>

ANEXOS

Anexo 1. Tabla con las 71 plantas que componen la horchata lojana.

Adaptado de (Rios et al., 2017).

Taxonomía Familia	Nombre nativo	Nombre científico	Partes a utilizar en la infusión	Usos terapéuticos
Adoxaceae	Sauco	<i>Sambucus nigra</i>	Flor	Sedante, Hepático, disminuye la hinchazón
Amaranthaceae	Escancel	<i>Aerva sanguinolenta</i>	Hojas punteagudas, sin raíz	Antiinflamatorio, diurético, reparador
	Moradilla	<i>Alternanthera porrigens</i>	Rama, flor	Antiinflamatorio, tónico, analgésico
Amaranthaceae	Ataco	<i>Amaranthus caudatus</i> L.	Hierba, inflorescencia	Carminativo, circulación, diurético, hepático
	Sangorache	<i>Amaranthus hybridus</i> L.	Hoja joven	Anti fluidos, vulnerario, diurético
	Chulku,	<i>Iresine diffusa</i>	Hojas	Sedante y antiinflamatorio
	Tigrecillo	<i>Iresine herbstii</i>	Hojas	Analgésico, diurético

Apiaceae	Hinojo		<i>Foeniculum vulgare</i>	Planta robusta	Antiespasmódico, emenagogo, galactógeno y tónico
	Culantrillo		<i>Diseción Niphogeton</i>	Planta sin raíz	Carminativo y analgésico
Asclepiadaceae	Cola de caballo	de	<i>Orthosia ellemannii</i>	Tallo sin hojas	Remineralizante y antiinflamatorio
Asteraceae	Lancetilla		<i>Gamochaeta americana</i>	Tallos erectos	Antidiurético, circulación de la sangre
	Manzanilla		<i>Matricaria recutita</i> L.	Flor pequeña	Sedante, analgésico, digestivo
Asteraceae	Zeraja o Kana yuyu		<i>Sonchus oleraceus</i> L.	Arbusto sin raíz	Antiinflamatorio, presión alta, hepático
	Anís		<i>Tagetes filifolia</i>	Hierba	Digestivo, cólico severo, sedante, carminativo
	Diente de		<i>Taraxacum</i>	Flor	Antiinflamato

	león	<i>officinale</i>		orio, hepático, depurativo
Begoniaceae	Begonia	<i>Begonia tuberhybrida</i>	× Flor y tallo carnoso	Tónico o sedante
Boraginaceae	Borraja	<i>Borago officinalis</i> L.	Flor	Emenagog o y analgésico
Brassicaceae	Alhelí	<i>Matthiola incana</i> (L.)	Flor amarilla	Cardiotónico o y analgésico
Caryophyllaceae	Clavel	<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Flores pétalos	Reparador, sedante y antiinflamatorio
Commelinaceae	Calcha	<i>Tradescantia zebrina</i> Heynh	Hojas	Sedante o febrífugo
	Calcha	<i>Callisia repens</i>	Hojas	Hipotensor
Equisetaceae	Cola de caballo	<i>Equisetum bogotense</i> Kunth	Ramas	Antiinflamatorio, hepático y diurético.
	Caballo chupa o cola de caballo	<i>Equisetum giganteum</i> L.	Planta completa menos la raíz	Antiinflamatorio y depurativo
Fabaceae	Tintanil	<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill	Flores	Disminuye la inflamación y actúa como tónico

Gentianaceae	Canchalagua	<i>Centaurium erythraea</i> Rafn	Planta completa	Tónico, antiinflamatorio y para la circulación de la sangre
Geraniaceae	Agujilla	<i>Erodium cicutarium</i> cf.	Ramas	Tónico y antiinflamatorio
Geraniaceae	Esencia de rosa o malva	<i>Pelargonium graveolens</i>	Hojas	Diurético, evita la diarrea, sedante y analgésico
	Malva olorosa	<i>Pelargonium odoratissimum</i>	Ramas	Analgésico, antiinflamatorio, carminativo, tónico
	Geranio rojo	<i>Pelargonium zonale</i>	Flores, pétalos	Diurético, vulnerario o antiséptico
Lamiaceae	Toronjil	<i>Melissa officinalis</i> L.	Ramas gruesas	Cardiotónico, digestivo, tónico
Lamiaceae	Hierba buena	<i>Mentha piperita</i> L.	x Hojas sin flor	Descongestiva, analgésico, carminativo
	Menta negra	<i>Mentha spicata</i>	Hojas	Tónico,

		L.		antitóxico, carminativo
	Albahaca de sal o negra	<i>Ocimum basilicum</i> L.	Hojas	Antidiarreico, digestivo, hepático, sedante
	Albahaca blanca dulce	<i>Ocimum campechianum</i> Mill.	Hojas	Reparador, anti-digestivo, analgésico, carminativo
Linaceae	Linaza	<i>Linum usitatissimum</i> L.	Semillas	Diurético, digestivo, hepático
Malváceas	Malva rosa o malvón	<i>Alcea rosea</i> L.	Flores	Tónico, analgésico y depurativo
	Malva blanca o altea	<i>Malva arborea</i>	Flor, hoja	Antiinflamatorio y tónico
	Malva blanca o alta	<i>Malva parviflora</i> L.	Flores y hojas	Depurativo, tónico y antiinflamatorio
Myrtaceae	Arrayán	<i>Myrcianthes hallii</i>	Hojas	Descongestionante, restauradora, y hepática
Onagraceae	Pena de la	<i>Fuchsia</i>	Flores	Sedante y

	montaña		<i>harlingii</i>		antinflamatorio
	Pena grande o roja		<i>Fuchsia hybrida</i>	Flores	Analgésico estomacal, antiflu, antiinflamatorio
Onagraceae	Pena rosa	pena	<i>Fuchsia loxensis</i>	Flores	Sedante o cardiotónico
	Pena morada	pena	<i>Fuchsia magellanica</i>	Flores	Calmante o sedante
	Flor de reina		<i>Ludwigia nervosa</i> (Poir.) H. Hara	Flores	Antiinflamatorio y calmante
	Shullu		<i>Oenothera rosea</i> L'Her. ex Aiton	Planta completa sin la raíz	Digestivo, hepático y antiinflamatorio
Orchidaceae	Maywa kichwa	en	<i>Epidendrum jamiesonis</i> Rchb. F.	Flores	Calmante, diurético y hepático
Oxalidaceae	Chulku kichwa	en	<i>Oxalis corniculata</i> L.	Ramas finas	Anti-diarrea, reparados y diurético
Piperáceas	Congona cerro	del	<i>Peperomia galioides</i>	Planta completa	Calmante, analgésico estomacal, diurético
	Congona negra o de		<i>Peperomia ilaloensis</i>	Planta entera	Analgésico y calmante

	castilla			
Piperáceas	Congona grande	<i>Peperomia inaequalifolia</i>	Ramas largas	Calmante, dirético, hepático
	Waviduca de dulce	<i>Piper crassinervium</i>	Hojas completas	Antiséptico, analgésico estomacal
Plantaginaceae	Llantén	<i>Plantago major</i> L.	Planta completa sin raíz	Vulnerario, analgésico estomacal, diurético
Poaceae	Hierba luisa	<i>Cymbopogon citratus</i>	Hojas	Calmante, dirético, analgésico
	Gramma dulce	<i>Cynodon dactylon</i>	Ramas finas	Hepático, diurético, antiinflamatorio
	Cebada	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Semillas	Digestivo, calmante y antiinflamatorio
Polypodiaceae	Calawala	<i>Niphidium crassifolium</i> (L.)	Raíces	Hepático y diurético
Proteaceae	Cucharillo, gañil	<i>Oreocallis grandiflora</i>	Flores	Agente hipoglicémico, hepático y digestivo
Pteridaceae	Doradilla plateada,	<i>Pityrogramma ebenea</i>	Hojas	Restaurador, analgésico

				estomacal, calmante.
Rosaceae	Saucillo	<i>Alchemilla aphanoides</i>	Ramas	Analgésico
	Fresa salvaje	<i>Duchesnea indica</i>	Hojas	Limpiador y reparador
Rosaceae	Rosa de castilla	<i>Rosa cymosa</i>	Flores	Digestivo, calmante y tónico
	Pimpinela	<i>Sanguisorba minor</i> subsp. <i>muricata.</i>	Flores y hojas	Depurativo, sedante y hemostático
Rutaceae	Naranja naranja	<i>Citrus x junos</i>	Hojas	Digestivo, calmante y analgésico estomacal
Solanáceas	Mortiño hierba mora	<i>Solanum americanum</i>	Hojas	Febrífugo, analgésico estomacal, digestivo
	Flor de quinde o del sol	<i>Streptosolen jamesonii</i>	Flores	Desinflama nte
Tiliaceae	Cadillo	<i>Triumfetta semitriloba</i>	Flores y hojas	Diurético, astringente, analgésico
Verbenaceae	Cedrón	<i>Aloysia triphylla</i> Royle	Flores y hojas	Cardiotónico, reparador, analgésico estomacal,

				carminativo
	Violeta	<i>Viola odorata</i> L.	Flores	Depurativo, evita problemas bronquiales , vulnerario, antiinflamato rio, digestivo, antitusivo
Violaceae	Pensamiento	<i>Viola tricolor</i> L.	Flores	Antiflu, analgésico, febrífugo, antiinflamato rio, antiséptico, ronquera, antidiarreic o.
Zingiberaceae	Caña agria	<i>Hedychium coronarum</i>	Vástagos	Antiinflamato rio, antiséptico, elimina sal y agua del cuerpo.

Anexo 2. Análisis estadístico de la correlación de los años de consumo del tabaco con la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

Correlaciones

			Años_Consumo	AC_Control_Fumadores
Rho de Spearman	Años_Consumo	Coefficiente de correlación	1,000	-,170
		Sig. (bilateral)	.	,487
		N	19	19
	AC_Control_Fumadores	Coefficiente de correlación	-,170	1,000
		Sig. (bilateral)	,487	.
		N	19	19

Anexo 3. Análisis estadístico de la correlación de la edad de los fumadores con la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

Correlaciones

			Edad_Fumadores	AC_Control_Fumadores
Rho de Spearman	Edad_Fumadores	Coefficiente de correlación	1,000	-,118
		Sig. (bilateral)	.	,631
		N	19	19
	AC_Control_Fumadores	Coefficiente de correlación	-,118	1,000
		Sig. (bilateral)	,631	.
		N	19	19

Anexo 4. Análisis estadístico de la correlación del número de tabacos que consumen los fumadores con la frecuencia de aberraciones cromosómicas.

Correlaciones

			Número_taba cos	AC_Control_F umadores
Rho de Spearman	Número_tabacos	Coefficiente de correlación	1,000	,014
		Sig. (bilateral)	.	,954
		N	19	19
	AC_Control_Fumadores	Coefficiente de correlación	,014	1,000
		Sig. (bilateral)	,954	.
		N	19	19

Anexo 5. Análisis estadístico de los tres tratamientos dentro de los fumadores, por medio de la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes y el valor p que indica igualdad de frecuencia entre los ensayos analizados.

Prueba de Kruskal-Wallis

Rangos

Tratamientos		N	Rango promedio
Frecuencia_AC	Control_sin_extracto	19	33,05
	Con_80_extracto	19	29,37
	Con_100_extracto	19	24,58
	Total	57	

Estadísticos de prueba^{a,b}

	Frecuencia_A C
H de Kruskal-Wallis	2,649
gl	2
Sig. asintótica	,266

Anexo 6. Análisis estadístico de los tres tratamientos dentro de los no fumadores, por medio de la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes y el valor p que indica igualdad de frecuencia entre los ensayos analizados.

Prueba de Kruskal-Wallis

Rangos

	Tratamientos	N	Rango promedio
Frecuencia_AC	Control	19	32,11
	Ext_80	19	27,45
	Ext_100	19	27,45
	Total	57	

Estadísticos de prueba^{a,b}

	Frecuencia_A C
H de Kruskal-Wallis	2,493
gl	2
Sig. asintótica	,288

Anexo 7. Imágenes de la metafase de algunos voluntarios fumadores

Las imágenes no se muestran por protección de la propiedad intelectual

Metafases de fumadores: En la imagen 1 y 2 se puede observar roturas de cromátide; en la 3, 4, 5 y 6 metafases normales después de ser sometidas al extracto de horchata. Imágenes por microscopía tomadas por la autora en el software CytoVision.

Anexo 8. Imágenes de la metafase de algunos voluntarios fumadores

Las imágenes no se muestran por protección de la propiedad intelectual

Metafases de fumadores: En la imagen 1 metafase con gap de cromosoma, en la 2 se puede observar un gap cromátide; en la 3, 4, 5 y 6 metafases normales después de ser sometidas al extracto de horchata. Imágenes por microscopía tomadas por la autora en el software CytoVision.

Anexo 9. Imágenes de la metafase de algunos voluntarios no fumadores

Las imágenes no se muestran por protección de la propiedad intelectual

Metafases de no fumadores: En la imagen 1 y 2 se puede observar roturas de cromátide; en la 3, 4, 5 y 6 metafases normales después de ser sometidas al extracto de horchata. Imágenes por microscopía tomadas por la autora en el software CytoVision.

Anexo 10. Frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas en las células sanguíneas de personas fumadoras y no fumadoras.

Esta tabla no se muestra por protección a la propiedad intelectual

Nota: En el total de aberraciones cromosómicas se presenta la frecuencia de AC \pm la desviación estándar.

