

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Genotoxicidad *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill

“qasa isqana” frente a ADN de *Staphylococcus aureus*.

Ayacucho, 2017.

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA**

Presentado por la:

Bach. HUAMÁN DE LA CRUZ, Roxana

Ayacucho – Perú

2018

A mis padres con todo cariño quienes me enseñaron el mejor camino a seguir, que con su apoyo y confianza logre culminar mi profesión.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a nuestra *Alma Mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga forjador de excelentes profesionales al servicio de la comunidad ayacuchana, dentro y fuera del país.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, así mismo a todos los docentes que me impartieron sus conocimientos y experiencias en el transcurso de mi vida estudiantil, gracias por prepararnos para un futuro competitivo no solo como los mejores profesionales sino también como mejores personas.

A mis asesores el Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich y Blga. Miriam Moreno Hinojosa, quienes accedieron a brindarme toda su paciencia, capacidad y experiencia científica.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional y confianza brindada en todo momento, a mis amigos que siempre estuvieron conmigo apoyándome en todo momento.

ÍNDICE

	Página
Dedicatoria	lii
Agradecimiento	V
Resumen	Xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedente	3
2.2 Marco teórico	8
2.2.1 <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill. “qasa isqana”	8
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.2.3 Toxicidad y Genotoxicidad	13
2.2.4 Evaluación genotóxica	15
2.2.5 Electroforesis en gel	16
2.2.6 Ácido nucleico	18
2.2.7 Ácido desoxirribonucleico (ADN)	18
2.2.8 Método Tomasevich Evaluación de la genotoxicidad <i>in vitro</i>	19
2.2.9 Ensayo cometa	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1 Lugar de ejecución	23
3.2 Población y muestra	23
3.3 Unidad experimental	23
3.4 Metodología y recolección de datos	23
3.4.1 Recolección de la muestra	23
3.4.2 Obtención de la muestra	23
3.4.3 Identificación fitoquímica	24
3.4.4 Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	24
3.4.5 Ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>	25
3.4.6 Fase de electroforesis	26
3.4.7 Fase de lectura por radiación UV	27
3.4.8 Fase de interpretación y clasificación de la genotoxicidad	27
3.5 Tipo de investigación	27

3.5.1 Diseño de investigación	27
3.6 Análisis de datos estadísticos	28
IV. RESULTADOS	29
V. DISCUSION	35
VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	45
ANEXO	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del látex obtenido de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill “qasa isqana”, frente al ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> .	26
Tabla 2	Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 1 para el ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> del látex obtenido de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill “qasa isqana”. Ayacucho 2018.	26
Tabla 3	Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.	27
Tabla 4	Diseño de investigación	28
Tabla 5	Metabolitos secundarios en el látex de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill “qasa isqana”. Ayacucho 2018.	29
Tabla 6	Valores numéricos del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del látex de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill “qasa isqana” a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	<i>Sonchus asper</i> (L.)Hill. “qasa isqana”	9
Figura 2	Estructura química del ADN.	19
Figura 3	Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> obtenido de siete muestras y coloreado con bromuro de etidio. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.	30
Figura 4	Ensayo preliminar de genotoxicidad <i>in vitro</i> del látex de <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018	31
Figura 5	Ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del látex de <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.	32
Figura 6	Reproducibilidad del ensayo genotóxico <i>in vitro</i> del látex de <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente, frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.	33

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Clasificación taxonómica de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill. “qasa isqana” Ayacucho 2017.	51
Anexo 2	Descripción botánica de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill. “qasa isqana” .Ayacucho 2017.	52
Anexo 3	Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i> Ayacucho 2018.	53
Anexo 4	Diagrama para la obtención del latex de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill. “qasa isqana”. Ayacucho 2018.	54
Anexo 5	Recolección y obtención del latex del <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill. “qasa isqana”. Ayacucho 2018.	55
Anexo 6	Metabolitos secundarios encontrados en el latex del <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill. “qasa isqana”. Ayacucho 2018.	56
Anexo 7	Proceso de cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> Ayacucho 2018.	57
Anexo 8	Proceso de extracción de ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> Ayacucho 2018.	58
Anexo 9	Proceso de preparación a diferentes concentraciones del látex de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill “qasa isqana”. Ayacucho 2018.	59
Anexo 10	Proceso para la determinación del efecto genotóxico del látex de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill “qasa isqana” frente a ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> . Ayacucho 2018.	60
Anexo 11	Diagrama de flujo de electroforesis.	61
Anexo 12	Matriz de consistencia	62

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la evaluación preliminar de la genotoxicidad *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”; este trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y en el Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en la ciudad de Ayacucho. El látex de la planta, fue obtenido al mismo instante de realizar los ensayos para la determinación genotóxica a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*, la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el “método Tomasevich”, mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS. Los metabolitos secundarios identificados en el látex del *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”, fueron cardenólidos en cantidad muy abundante; flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, aminoácidos y/o péptidos libres en cantidad abundante. El látex del *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, y 100%, ha degradado la totalidad del ADN genómico de *Staphylococcus aureus*. Se llegó a la conclusión, que el látex del *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”, presenta una potente actividad genotóxica frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

Palabras clave: Genotoxicidad, ADN genómico, *Sonchus asper* (L). Hill.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú presenta una riqueza y megadiversidad de plantas medicinales nativas que constituye uno de los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional, desde la época pre incaica hasta la actualidad, siendo estas utilizadas en forma empírica por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud.¹ En los últimos años los análisis de genotoxicidad han alcanzado gran importancia, realizándose con el fin de identificar posibles daños a nivel del ADN para el ser humano ya que se ha detectado extractos de plantas medicinales que poseen actividad embriotóxica y/o teratogénica, y se ha reportado actividad mutagénica y carcinogénica en productos de origen vegetal encontrándose que existe una correlación positiva entre la ocurrencia de enfermedades y tumores en la población.² El *Staphylococcus aureus* produce una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía.³

Si bien es cierto *Sonchus asper* (L.) Hill “qasa isqana” es una planta introducida en nuestro país, en medicina tradicional el extracto presenta actividad antibacteriana, hepatoprotector y cardiotónicas.⁴ Que nos hace pensar que este látex también posee efecto genotóxico a las células del organismo que reciben el tratamiento. Los resultados del presente proyecto de investigación servirán para evaluar el daño del látex fresco de *Sonchus asper* (L.) Hill “qasa isqana” sobre el ADN de *Staphylococcus aureus*, así como su posterior sugerencia al empleo en la medicina tradicional.

Uno de los ensayos útiles para la detección de daño simple y de doble cadena al ADN es la electroforesis de una sola célula (Ensayo Cometa), donde se evalúan los niveles de daño y reparación al ADN en poblaciones celulares sin la necesidad de trabajar con células en proliferación. Es un sistema potencialmente sensible para evidenciar daño genotóxico inducido.⁵ El fundamento de esta

técnica consiste en lisar las células de interés, embebidas en un gel de agarosa, por medio de detergentes y altas concentraciones de sal. Posteriormente el ADN liberado será sometido a la acción de un campo eléctrico a pH neutro.^{5, 6} En las células en las que exista incremento del daño al ADN se formarán pequeños fragmentos, estos al ser sometidos a una corriente eléctrica tendrán la propiedad de penetrar en la malla de agarosa migrando de esta manera hacia el ánodo. La capacidad del ADN de migrar hacia el ánodo dependerá del tamaño, forma y peso molecular de los fragmentos generados por la lesión. Por medio de la coloración con bromuro de etidio (colorante con afinidad por el ADN) darán la imagen de pequeños cometas. El largo del cometa se incrementa con el daño inducido a la doble hélice del ADN.^{6, 7, 8} El interés sobre el ensayo cometa se ha incrementado notablemente en los últimos años, debido a que ha demostrado ser un método extremadamente sensible en la detección del daño al ADN a nivel celular.^{9, 10}

En el presente estudio, la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el “método Tomasevich”, que consiste en exponer al ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones del látex de “qasa isqana” a 37°C, luego sometido a electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*, constituyendo un método eficaz y eficiente para determinar la genotoxicidad de las plantas medicinales.¹¹

Se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Determinar la genotoxicidad *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”
- Evaluar la genotoxicidad *in vitro* del látex de *Sonchus asper*(L). Hill “qasa isqana”.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio.

Estudio realizado por Florence y Col⁴ mencionan que muchos materiales vegetales están sub-explotados debido a un conocimiento científico inadecuado de sus potenciales nutricionales y curativos; motivo por el que estudiaron las propiedades nutricionales, fitoquímicas, antioxidantes y antibacterianas de los extractos con acetona, metanol y agua de las hojas de *Sonchus asper* y *Sonchus oleraceus*. El análisis mostró que las plantas contenían un porcentaje apreciable de humedad, ceniza, proteína cruda, lípido crudo, fibra cruda e hidratos de carbono. También son ricas en flavonoides, flavonoles, proantocianidinas, fenoles totales y bajos niveles de saponinas, fitato y alcaloides. Los extractos de las dos plantas también mostraron fuertes propiedades antioxidantes; así mismo, los extractos con acetona y metanólico de *Sonchus asper*, presentaron actividad antibacteriana frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus kristinae*, *Streptococcus pyrogens*, *Escherichia coli*, *Salmonella pooni*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.¹²

Rahmat A. y Col.¹² estudiaron *Sonchus asper* de frecuente uso tradicional para el tratamiento de varias dolencias asociadas con el hígado, los pulmones y los riñones. Este estudio tuvo como objetivo investigar el potencial terapéutico de extractos crudos no polares (hexano, acetato de etilo y cloroformo) y polares (metanol) de toda la planta, que evaluaron frente al tetracloruro de carbono (CCl₄) induciendo lesiones hepáticas en ratas. Mostrando evidentes efectos hepatoprotectores.

Así mismo, Rahmat A. y Col.¹³ estudiaron los efectos antioxidantes del extracto metanólico de *Sonchus asper* contra la nefrotoxicidad inducida por CCl₄ en ratas macho Sprague-Dawley. CCl₄ (3 ml/kg, 30% en aceite de oliva) quincenalmente

durante 4 semanas indujo peroxidación lipídica, como se refleja por un aumento significativo; disminuyó las defensas antioxidantes renales, como lo revela una disminución del nivel de GSH, CAT, SOD, GST, GSR, GSH, mientras que elevó el nivel de contenido de γ -GT, H_2O_2 y nitrito. CCl_4 causó lesiones histopatológicas y aumentó significativamente el recuento de AgNOR renal y el daño al ADN. La actividad de la telomerasa en el riñón se determinó positiva con el tratamiento con CCl_4 . La concentración de creatinina, urobilinógeno y urea aumentó mientras que el aclaramiento de creatinina disminuyó en suero y orina. El nivel de proteína y albúmina aumentó en la orina mientras que se redujo en suero. El nivel sérico de nitrito se incrementó con el tratamiento con CCl_4 . El tratamiento de ratas con *Sonchus asper* (100, 200 mg/kg) mejoró eficazmente las alteraciones inducidas con CCl_4 en peroxidación lipídica, defensas antioxidantes, marcadores bioquímicos, genotoxicidad y lesiones renales. Los datos actuales sugieren que *Sonchus asper* protege los riñones posiblemente aliviando el estrés oxidativo inducido con CCl_4 en la rata.

Muhammad R. y Col¹⁴ realizaron estudios de efectos protectores del extracto de metanol de *Sonchus asper* contra el daño oxidativo inducido por $KBrO_3$ en tejidos cardíacos de rata se determinaron en este estudio. Las ratas macho Sprague-Dawley (180 a 200 g) se dividieron en cinco grupos. Grupo I: solución salina recibida (1 ml/kg, 0,85% NaCl) grupo II: se inyectaron $KBrO_3$ (20 mg/kg); grupo III y IV: tratados con $KBrO_3$ y después de 48 con *Sonchus asper* (100; 200 mg/kg) y grupo V: con *Sonchus asper* (200 mg/kg). Todos los tratamientos se administraron dos veces por semana durante cuatro semanas. Los resultados revelaron que el estrés oxidativo inducido por $KBrO_3$ se evidenció por la disminución significativa en los niveles de actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, POD, SOD, GSH-Px, GSR, GST, QR, XO) y glutatión (GSH), mientras que el aumento en los niveles de γ -GT, MDA y H_2O_2 en muestras cardíacas en comparación con el grupo control. Los niveles séricos de CK, CK-MB, LDH, ácido úrico, AST, ALT, ALP, triglicéridos, colesterol total, LDL, VLDL se elevaron mientras que el nivel de HDL se redujo significativamente en el grupo $KBrO_3$ en comparación con el control. Dado que el mismo tratamiento revirtió estas respuestas de forma dependiente de la dosis, parece probable que el extracto de metanol de *Sonchus asper* pueda proteger los tejidos cardíacos contra el daño oxidativo mediado por $KBrO_3$.

Rahmat A. y Col¹⁵ también estudiaron *Sonchus asper* usado tradicionalmente como medicina popular para tratar trastornos mentales en Pakistán. Su estudio demostró el efecto de la fracción metanólica rica en polifenólicos de *Sonchus asper* sobre el rendimiento cognitivo, las actividades antioxidantes del cerebro y la actividad de la acetilcolinesterasa en ratas macho.

Montes y Col¹⁶ reportó un estudio con el objetivo de determinar el efecto genotóxico *in vitro* del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” frente a ADN genómico humano, e identificar sus metabolitos secundarios. El látex lo obtuvo directamente de la raíz de la planta. Realizó las reacciones de Mayer, Dragendorff y Wagner, para la identificación de alcaloides, el ensayo de FeCl₃ para fenoles y taninos, y Baljet para lactonas y/o cumarinas. La evaluación de la genotoxicidad *in vitro* por la fragmentación del ADN, fue determinado con el “método Tomasevich” preparando el látex a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100 %, 6 µL de cada uno de éstos enfrentó sobre 14 µL de ADN genómico humano a concentración de 1,500 ng/µL, tuvo como “blanco” el látex al 100%, como “control” 14 µL de ADN; incubaron a 37°C durante una hora, respectivamente; estos productos, además de un marcador de tamaño molecular (50 pb), sometieron a electroforesis a 40 voltios durante tres horas en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, luego se visualizó en radiación de luz ultra violeta y se tomó el registro fotográfico con Biometra *UVsolo TS*. Los resultados del tamizaje fitoquímico del látex identificaron la presencia de fenoles y taninos en cantidad abundante y alcaloides en cantidad leve. Los corridos electroforéticos, revelaron que el látex a concentraciones de 10% y 25%, han fragmentado entre 40% a 95% del ADN, mientras que el látex a 50% y 100 % han fragmentado totalmente al ADN genómico humano. La prueba de Kruskal Wallis ($p=0,027$), permitió determinar que sí existe diferencia en la actividad genotóxica del látex, según su concentración. Concluyeron que el látex de *Taraxacum officinale* “diente de león”, presenta un efecto genotóxico importante frente a ADN genómico humano.

Montes y col¹⁷ realizó un estudio con el objetivo de determinar la genotoxicidad *in vitro* del látex de una planta medicinal de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” frente a ADN genómico humano, e identificar sus metabolitos secundarios. El látex fue obtenido directamente de la base del tallo de la planta. Realizó las reacciones de Mayer, Dragendorff y Wagner, para la identificación de alcaloides, el ensayo de FeCl₃ para fenoles y taninos, y Baljet para lactonas y/o

cumarinas. La evaluación de la genotoxicidad *in vitro* por la fragmentación del ADN, lo determinaron con el “método Tomasevich” preparando el látex a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100%, 6 μL de cada uno de éstos se enfrentó sobre 14 μL de ADN genómico humano a concentración de 1,500 ng/ μL , tuvo como “blanco” el látex al 100%, como “control” 14 μL de ADN; incubaron a 37°C durante una hora, respectivamente; estos productos, además de un marcador de tamaño molecular (50pb), sometieron a electroforesis a 40 voltios durante tres horas en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, luego se visualizó en radiación de luz ultra violeta y tomó el registro fotográfico con Biometra *UVsolo TS*. Los resultados del tamizaje fitoquímico del látex permitieron identificar la presencia de alcaloides, fenoles y taninos en cantidad abundante, y lactonas y/o cumarinas en cantidad leve. El corrido electroforético, de las cuatro repeticiones realizadas, revelaron los mismos resultados, que el látex a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100 %, han fragmentado totalmente al ADN genómico humano; no existe diferencia en la actividad genotóxica del látex, según su concentración. Concluyeron que el látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”, presenta un efecto altamente genotóxico frente a ADN genómico humano.

Moreno y Col¹⁸ desarrollaron un estudio planteando como objetivos determinar el efecto genotóxico *in vitro* de una planta medicinal antiverrucoso *Euphorbia peplus* L. “leche leche” frente a ADN genómico humano, e identificar sus metabolitos secundarios. El látex fue obtenido directamente de la base del tallo de la planta. Realizaron las reacciones cualitativas fitoquímicas y la evaluación de la genotoxicidad *in vitro* por la fragmentación del ADN, fue determinado con el “método Tomasevich”, prepararon diluciones del látex a concentraciones de 5%, 10%, 25%, 50% y 100 %, 6 μL de cada uno de éstos se enfrentó sobre 14 μL de ADN genómico humano a concentración de 1,500 ng/ μL , tuvo como “blanco” el látex al 100%, como “control” 14 μL de ADN y como “descarte de nucleasas”, colocando 14 μL de ADN más 6 μL de látex a 100% más 6 μL de proteinasa K. Esta batería de tubos fue incubada en baño María a 37°C durante una hora. Estos productos, además de un marcador de tamaño molecular (50 pb), sometieron a electroforesis a 40 voltios durante tres horas en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, luego se visualizó en radiación de luz ultra violeta y tomaron el registro fotográfico con Biometra *UVsolo TS*. El tamizaje fitoquímico permitió identificar alcaloides, flavonoides y principio amargo y astringente en

cantidad abundante, fenoles y taninos, y saponinas en cantidad moderada, lactonas y/o cumarinas en cantidad leve. Los resultados de los corridos electroforético revelaron que el látex a concentraciones de 5%, 10%, 25%, 50% y 100 %, han fragmentado totalmente al ADN genómico humano. Los tiempos de incubación según Mann-Whitney ($p=0,539$) no influye en la genotoxicidad del látex de “leche leche”, pero sí la concentración del látex, Kruskal-Wallis ($p=0,000$). Concluyeron que el látex de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” presenta un efecto altamente genotóxico frente a ADN genómico humano.

Moreno y Col¹⁹ reportan un estudio de evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. “papaya”, frente a ADN genómico humano. El látex fue obtenido directamente del fruto no maduro, la cristalización de látex fue en incubadora a 37°C durante 7 días. La evaluación de la genotoxicidad *in vitro* por la fragmentación del ADN, fue determinado con el “método Tomasevich” preparando dos baterías de tubos: uno para látex fresco y otro para látex cristalizado a concentraciones de 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50% y 100 %, 6 μ L de cada uno de éstos se enfrentó sobre 14 μ L de ADN genómico humano a concentración de 1,500 ng/ μ L, usaron como “blanco” el látex al 100%, como “control” 14 μ L de ADN y un tubo que contenía el látex al 100%, ADN más proteinasa K; cada batería de tubos fueron incubados a 37°C durante una hora; estos productos, además de un marcador de tamaño molecular (50 pb), sometieron a electroforesis a 40 voltios durante tres horas en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, luego visualizó en radiación de luz ultra violeta y se tomó el registro fotográfico con Biometra *UVsolo TS*; realizaron cuatro repeticiones de estos ensayos. Todos los registros fotográficos de los corridos electroforéticos, revelan que las siete concentraciones ensayadas de 1% al 100% de látex fresco, fragmentaron totalmente al ADN genómico humano; mientras que las concentraciones de 10%, 25% y 50% de látex cristalizado, han fragmentado entre 20% al 40% del ADN y a concentración de 100% de látex cristalizado degradado entre el 40% al 95% del ADN genómico humano, demostrando que la genotoxicidad del látex cristalizado si depende de su concentración.

El tubo que contenía látex fresco al 100%, proteinasa K y ADN, también muestra fragmentación total del ADN, corroborando que este efecto fue por acción de los metabolitos secundarios, mas no por la actividad de nucleasas que podrían estar presentes en el látex, debido a que ellas fueron destruidas por acción de la

proteínasa K en el periodo de incubación. Concluyeron que el látex fresco de *Carica papaya* L. “papaya” presentan una potente actividad genotóxica frente a ADN genómico humano, mientras que la de látex cristalizado, depende de su concentración.

2.2 Marco conceptual

2.2.1 *Sonchus asper* (L.) Hill. “qasa isqana”

2.2.1.1 Clasificación Taxonómica

La identificación botánica se realizó según el sistema de clasificación de Cronquist A 1988 a cargo de la Blga. Laura AUCASIME MEDINA (Anexo N° 01), de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga:

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Sub clase	:	Asteridae
Orden	:	Asterales
Familia	:	Asteraceae
Género	:	<i>Sonchus</i>
Especie	:	<i>Sonchus asper</i> (L.)Hill.
Nombre Vulgar	:	“qasa isqana”

2.2.1.2 Descripción botánica

Planta herbácea, anual, con abundante látex de color blanco lechoso, las hojas son simples, sésiles, con lóbulos irregulares, de bordes dentados, glabras de disposición alterna, siendo las hojas basales más grandes y con las vainas que abrazan al tallo (hojas envainadoras).

Las inflorescencias se presentan formando numerosas cabezuelas o capítulos, rodeadas por un involucre formado por varias hileras de brácteas verdosas, las flores son pequeñas de color amarillo tenue o blanquecino, heteroclamídeo, pentámero y bisexual. Cáliz modificado en vilano formado por un penacho de pelos finos y blanquecinos; corola ligulada formado por cinco pétalos soldados en la base formando un tubo y se prolongan en una sola pieza a manera de una lengüita; cinco estambres sinandro o sinanterio con los filamentos libres y anteras soldadas; ovario ínfero bicarpelar, unilocular y uniseminado. Fruto seco indehiscente del tipo aquenio provisto por un penacho de pelos blanquecinos (vilano), que le sirve como medio de dispersión por el viento.²⁰



Figura 1: *Sonchus asper* (L.)Hill. “qasa isqana”

2.2.1.3 Habitad y Distribucion geográfica

Es una especie originaria de Europa. Crece en forma silvestre costa, sierra y selva como maleza en los cultivos, terrenos abandonados, huertos y jardines generalmente en zonas húmedas. Se encuentra en todas las estaciones del año de preferencia en época lluviosa donde florece y fructifica. Se propaga mediante semillas.²⁰

2.2.1.4 Composición química

La planta es rica en minerales, flavonoides, flavonoles, proantocianidinas, fenoles totales y bajos niveles de saponinas, fitato y alcaloides. Los estudios químicos de *Sonchus asper* revelaron la presencia de ácido ascórbico, carotenoides y ácidos grasos. Los compuestos fenólicos se presentan con mayor frecuencia a quien se debe los efectos antialérgicos, antimicrobianos, antiartreogénicos, antitrombóticos, antiinflamatorios, vasodilatadores y cardioprotectores. El ácido tánico, quercetina y catequina contribuyen a las actividades antioxidantes.^{4, 12}

2.2.1.5 Usos tradicionales

Esta planta es usada en la medicina popular en infusión o como extracto para cólicos hepáticos y renales, como depurativos de la sangre, antiespasmódico y otros; también se utiliza como alimento, consumiendo las hojas como hortalizas.²⁰ (Anexo 2)

2.2.1.6 Propiedades fitofarmacológicas

Sonchus asper “qasa isqana” se utiliza en el tratamiento de: heridas por quemaduras, tos, bronquitis y asma, amígdalitis, inflamación de los riñones, disfunción eréctil en hombres, fiebre, estreñimiento, diabetes, sarna y enfermedades del corazón⁴

Actividad antimicrobiana: Los extractos con acetona y con metanol de *Sonchus asper*, presentaron actividad antibacteriana frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus kristinae*, *Streptococcus pyrogens*, *Escherichia coli*, *Salmonella pooni*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*⁴

Actividad antioxidante: Los extractos de *Sonchus asper* presentaron una notable capacidad para barrer todas las especies reactivas ensayadas con IC₅₀ valores que se encuentran en el nivel g / ml. El mismo que fue demostrado por tener los más altos TPC mientras más bajos de IC₅₀ valores para el DPPH, ABTS capacidades de depuración de radicales y la eficiencia de eliminación de quelante de hierro, por otra parte, tenían mejores actividades en la compactación de los radicales superóxido y peróxido de hidrógeno, así como potentemente barrido los radicales hidroxilos.¹²

Actividad Hepatoprotectora: El extracto metanólico de *Sonchus asper* en el tratamiento con CCl₄, de manera significativa (P <0.01) redujo los niveles de T₃ y T₄ y aumentó los niveles de TSH, lo cual reduce las actividades de las enzimas antioxidantes, pero aumentó la peroxidación lipídica y el daño del ADN. La administración concomitante de SAME, mejoró significativamente (P <0.01) estas alteraciones con respecto a los niveles hormonales.¹²

2.2.1.7 Látex

El látex es una suspensión acuosa coloidal compuesta de algunas grasas, ceras y diversas resinas gomosas obtenida a partir del citoplasma de las células laticíferas presentes en algunas plantas angiospermas y hongos. Es frecuentemente blanco, aunque también puede presentar tonos anaranjados, rojizos o amarillentos dependiendo de la especie, y de apariencia lechosa.²¹

El látex es una sustancia con una composición de gran complejidad, puesto que entre sus elementos constituyentes se encuentran gomas, aceites, azúcares, sales minerales, ácidos nucleicos, proteínas, alcaloides, terpenos, ceras, hidrocarburos, almidón, resinas, taninos y bálsamos. Pero lo cierto es que la

cantidad de cada uno de estos compuestos varía moderadamente en función de una serie de factores, tales como la especie vegetal, la parte de la planta en la que se encuentra, la época del año, pues la composición no será la misma en verano que en invierno, o el tipo de suelo sobre el que crece el vegetal.

Cuando sale del árbol el látex presenta, por norma general, un pH prácticamente neutro que oscila entre 7.0 y 7.2, aunque al entrar en contacto con el aire se vuelve ácido. Transcurridas entre doce y veinticuatro horas desde su extracción, el pH desciende a 5.0, sobreviniéndose la coagulación de la sustancia cuando se sitúa con un pH igual o inferior a 4.2.²²

2.2.2. *Staphylococcus aureus*

Conocido como estafilococo áureo o estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, aunque no infectadas, por ella.

Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria³.

En la actualidad, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos, lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente.²³

2.2.2.1 Clasificación taxonómica

La identificación taxonómica se realizó según Rosenbach 1984 a cargo del Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich (Anexo N°3) responsable del Centro de Investigación de Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga:

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Bacillales
Familia	: Staphylococcaceae
Género	: Staphylococcus
Especie	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2.2.2.2 Morfología

Staphylococcus aureus es un coco inmóvil, de 0,5 a 1 μm de diámetro,¹⁵ que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. *Staphylococcus aureus* es un microorganismo grampositivo pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como gramnegativos.³

2.2.2.3 Hábitat

Se encuentra habitualmente a nivel de la nasofaringe y de zonas húmedas como pliegues inguinales y axilas. A nivel del vestíbulo nasal anterior la adherencia parece estar mediada por el contenido en ácidos teicoicos. Se estima que el índice de portación nasal en los adultos es de alrededor del 20-30%. Expresado longitudinalmente, cerca del 30% de la población puede ser portador permanente, el 50% portador intermitente y el 20% no es colonizado. Algunas poblaciones pueden tener una tasa de colonización mayor como el personal de salud, los pacientes en hemodiálisis, diabéticos, adictos a drogas intravenosas, etc. A pesar que *Staphylococcus aureus* posee numerosos factores de virulencia, puede convivir con el huésped humano formando parte de su flora normal sin causar ningún daño.²⁴

2.2.2.4 Metabolismo

Staphylococcus aureus se desarrolla rápidamente en todos los medios, fermentan lentamente en carbohidratos, como el manitol, pero no produce gas.

La actividad proteolítica varía mucho de una cepa a otra. *Staphylococcus aureus* produce pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso.¹⁷ *Staphylococcus aureus* tiene un metabolismo anaerobio facultativo, con excepción de las subespecies *Staphylococcus aureus anaerobius* y *Staphylococcus aureus saccharolyticus* que crecen de forma anaerobia y a menudo son catalasa-negativas.²⁴

2.2.3 Toxicidad y genotoxicidad

2.2.3.1 Toxicidad

La toxicidad es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él. Tóxico es cualquier sustancia, artificial o natural, que posea toxicidad; es decir, cualquier sustancia que produzca un efecto dañino sobre los seres vivos al entrar en contacto con ellos.²⁵

2.2.3.2 Genotoxicidad

Es la capacidad relativa para causar daño al material genético por agentes físicos, químicos o biológicos. El daño en el material genético incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula. Ejemplos de esto último son las proteínas que intervienen en la reparación, condensación y descondensación del ADN en los cromosomas u otras estructuras como el huso mitótico, responsable de la distribución de los cromosomas durante la división celular. Este daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno.^{26, 27}

Las pruebas de genotoxicidad se puede definir como pruebas *in vitro* e *in vivo*, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos; son necesarios antes de que se produzca la exposición en el ser humano.²⁸

Los agentes capaces de ocasionar toxicidad genética son llamados genotóxicos o xenobióticos y se clasifican en tres categorías de acuerdo a su origen: químicos, físicos y biológicos. La primera categoría está constituida por los compuestos químicos, la segunda incluye las radiaciones en todo su espectro y la última en algunos parásitos, bacterias, hongos, vegetales o incluso virus (aunque estos últimos no son considerados seres vivos, por lo que muchas veces aparecen clasificados en una categoría aparte). La acción o capacidad de inducir daño de estos xenobióticos está influida por la dosis recibida y el tiempo o

vía de exposición, junto a la constitución genética del individuo que puede definir una susceptibilidad propia o particular.²⁹

2.2.3.3 Mecanismo de genotoxicidad

Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente mediante la afectación de las enzimas involucradas en la replicación del ADN y causando en consecuencia mutaciones que pueden o no desembocar en un proceso canceroso.²⁷

Los mutágenos y carcinógenos genotóxicos son compuestos electrófilos muy reactivos y con gran afinidad por el ADN, como los derivados de compuestos orgánicos nitrogenados o halogenados, epóxidos, lactonas o compuestos inorgánicos de níquel, cromo, uranio, etc.

Los genotóxicos pueden provocar mutaciones por cambios en algunos nucleótidos debidos a:³⁰

- Sustituciones en las bases: purinas por otras purinas, pirimidinas por otras pirimidinas o purinas por pirimidinas o viceversa.³¹
- Sustitución de una base por una sustancia análoga originando un nucleótido inútil para la duplicación.
- Alteración química de las bases mediante oxidación, desaminación.
- Alquilación de la molécula del ADN incorporando grupos químicos a las bases, mediante enlaces covalentes, formando lo que se conocen como aductos.^{31,32}
- Desfases que consisten en la adición o delección de bases, modificando la pauta de lectura.

También, pueden provocar aberraciones cromosómicas como:

- Lesiones cromosómicas por rotura, delección, intercambio o reorganización del material cromosómico y translocaciones.
- Cambio en el número de cromosomas.³²

Tras la lesión producida en el ADN, la célula puede sufrir tres procesos:

- Impedimento de la replicación produciendo la muerte por apoptosis.
- Replicación con nucleótidos alterados, o con errores en la replicación del ADN, es decir, se trasmite una mutación. Esta mutación puede ocurrir en una célula somática dando por ejemplo un proceso canceroso o malformaciones congénitas en el recién nacido; o en una célula germinal produciendo una enfermedad hereditaria o generando en el individuo una mayor susceptibilidad de contraer determinadas enfermedades.³¹

- Reparación del daño en la molécula de ADN evitándose la mutación.³³

En cuanto a los carcinógenos genotóxicos, actúan como iniciadores del proceso de carcinogénesis. Esta comienza con una mutación en una sola célula pudiendo ser a nivel del metabolismo del xenobiótico, haciendo que una sustancia procancerígena se convierta en cancerígena; en la reparación del ADN dificultándola o impidiéndola y/o estimulando la proliferación celular.³¹ Este proceso se conoce como iniciación.³³

Suelen ser sustancias químicas, como compuestos alquilantes (mostazas nitrogenadas), especies reactivas de oxígeno, aflatoxinas, productos de combustión, nitrosaminas, etc.³⁴ Su mecanismo de acción está basado en la formación de enlaces covalentes con el nitrógeno 7 de la guanina (aducto), produciéndose una mutación irreversible. Algunas características de ellos son:

- Activos a todas las dosis, no hay una dosis mínima umbral a partir de la cual se aprecie un efecto.
- Presentan una correlación estructura, actividad, pudiéndose detectar mediante ensayos experimentales.
- La mayoría se clasifican como procarcinógenos, es decir, requieren una biotransformación para reaccionar con el ADN, la cual se puede producir tanto en la Fase I como en la Fase II del metabolismo. Aquí podemos encontrar hidrocarburos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas, micotoxinas, etc.³⁵

2.2.4 Evaluación genotóxica

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afecciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), a los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica.²⁸

Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica especial para su evaluación genotóxica, por lo que deben ser sometidas a las mismas regulaciones que rigen los fármacos en general. La evaluación genotóxica de

extractos de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de mutaciones genéticas y cromosómicas.²⁹

En el mundo las guías o rutas críticas para los estudios genotóxicos persiguen como objetivo fundamental evidenciar qué tipo o a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por el compuesto evaluado. En concordancia con ello se reconocen cuatro niveles: mutación génica (nivel I), mutación cromosómica (nivel II), daño primario del ADN (nivel III), transformaciones celulares (nivel IV), entre otras alteraciones. Los ensayos pertenecientes a los dos primeros niveles son muy variados y ampliamente utilizados, en especial las pruebas *in vitro* que se caracterizan por tener una alta sensibilidad y precisión. En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.³⁰

Si los resultados *in vitro* son negativos, debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*. Una vez evaluados los niveles génico y cromosómico, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan daño primario al ADN y de acuerdo con el resultado obtenido, se debe tomar la decisión de realizar ensayos que midan otras alteraciones y carcinogenicidad. En cualquiera de los ensayos y niveles de daño evaluados se deben emplear protocolos estandarizados (validados internacionalmente) que tomen en consideración las dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta para el fármaco.²⁹

Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en el campo de la investigación científica para detectar genotoxicidad inicial: aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas; micronúcleos, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa).²⁹

2.2.5 Electroforesis en gel

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran en un campo eléctrico a una velocidad determinada por su relación carga: masa, si dos moléculas tienen masa y formas iguales, la de mayor carga neta se desplazará más rápido hacia un electrodo.³⁰

Cuando se digiere una molécula de ADN con una enzima de restricción apropiada, se corta en fragmentos específicos. Estos fragmentos se pueden separar en función de su tamaño, por medio de una electroforesis en gel. Para ello, el ADN cortado se coloca en un gel de agarosa o poliacrilamida. Cuando pasa una corriente eléctrica a través del gel, cada fragmento se desplaza hacia abajo con una velocidad proporcional al logaritmo de su peso molecular. El desplazamiento produce una serie de bandas. Cada banda corresponde a un fragmento de tamaño definido, que es de menor cuando más abajo está en el gel. La longitud de cualquier fragmento concreto se puede determinar calibrando el gel. Para ello, en otro carril del mismo gel se hace correr un control paralelo. El control es una mezcla de fragmentos patrón, que tiene tamaños conocidos y se llaman marcadores. La migración de los marcadores define la relación entre la longitud de fragmento y la distancia recorrida en el gel.³¹

La electroforesis en gel es un modo conveniente de cuantificar el ADN y analizar su estado físico al mismo tiempo, se puede visualizar si existen contaminantes que pueden estar presentes en la muestra de ADN o si está degradado. Es la aplicación de las técnicas de separación de macromoléculas en un campo eléctrico en función de su tamaño y carga eléctrica superficial, se define como el método de separación de sustancias cargadas al aplicar un campo eléctrico, de modo que se diferencian en el comportamiento en un campo eléctrico. Aquellas partículas cargadas positivamente (cationes) migraran hacia el cátodo y las cargadas negativamente (aniones) hacia el ánodo.³²

Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles. El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un período de tiempo determinado. Cada muestra comenzará a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrará a una distancia distinta respecto al origen.³³

Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo fosfato, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los ácidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo

eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis. El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con tris-Borato (no glicina), para garantizar que los ácidos nucleicos estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis de inmersión. Las moléculas migrarán hacia el polo positivo, de modo que viajarán en esa dirección por el gel, separándose por tamaño (número de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente o de corrida (6X loading dye) que nos permita detener la electroforesis en el momento que lo creamos oportuno. Para visualizar las bandas, hay que teñir el gel o marcar radiactivamente las moléculas. El método más utilizado en geles de agarosa es el bromuro de etidio, el cual se comporta como un agente intercalante, de modo que además de disminuir la densidad de la molécula, tiene la capacidad de emitir luz cuando se le excita con luz ultravioleta. Hay que tener cuidado con este compuesto ya que es altamente cancerígeno.³⁴

La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas y fragmentos de DNA y RNA. Tiene dos mecanismos de separación: la electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y el tamizado por el gel, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.³⁴

2.2.6 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son macromoléculas, incluso mayores que las proteínas y así tienen una amplia posibilidad para transmitir información en la forma de agrupamiento de grupos químicos con una complejidad comparable a la disposición de los aminoácidos en las proteínas.³⁶

Los ácidos nucleicos se forman cuando los nucleótidos se unen entre sí por medio de puentes diéster entre átomos de C3 de un nucleótido y el C5. La secuencia lineal de los nucleótidos generalmente se expresa en dirección 5' a 3'.³⁷

2.2.7 Ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA)

El ADN o ácido desoxirribonucleico es el componente químico primario de los cromosomas y el material del que los genes están formados, es el almacén de la información que cada individuo posee y que necesita para llevar a cabo todas sus funciones vitales.³⁷

La molécula de ADN está formada por dos largas cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una estructura en doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos que constituyen una molécula de ADN, se mantienen unidas entre sí por enlaces entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas que quedan enfrentadas.³⁷

Los componentes del ADN (polímero) son los nucleótidos (monómeros); cada nucleótido está formado por un grupo de fosfato, una desoxirribosa y una base nitrogenada. Existen cuatro bases: dos purínicas denominadas adenina (A) y guanina (G) y dos pirimidicas denominadas citosina (C) y timina (T). La estructura en doble hélice del ADN, con el apareamiento de bases limitado (adenina con timina y guanina con citosina), implica que el orden o secuencia de bases de una de las cadenas delimita automáticamente el orden de la otra, por eso se dice que las cadenas son complementarias.³⁸

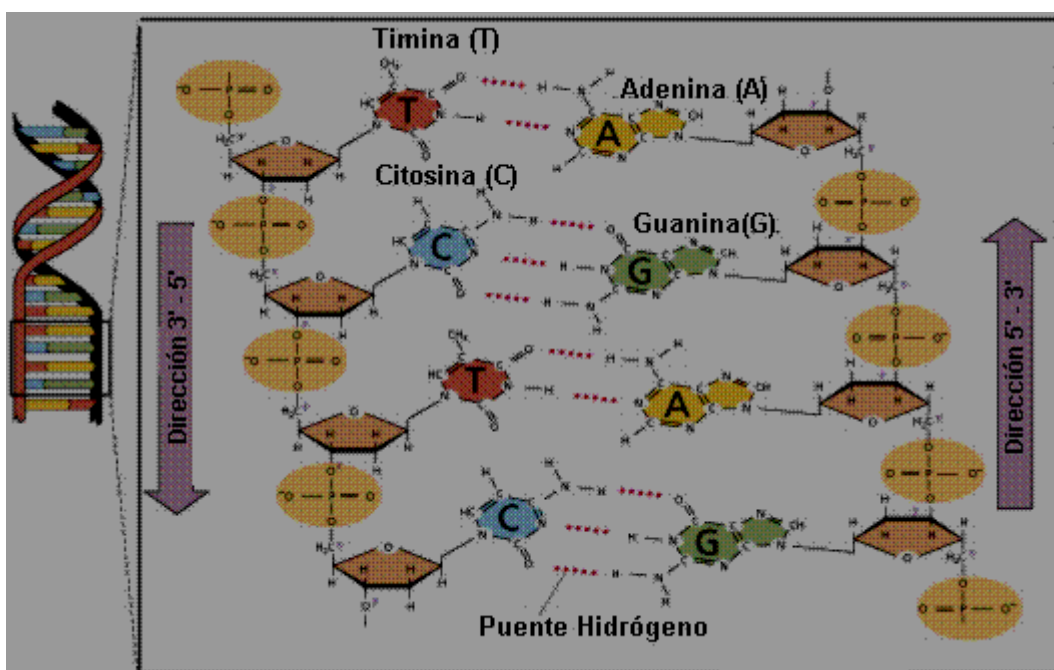


Figura 2. Estructura química de ADN

2.2.8 Evaluación de la genotoxicidad *in vitro*: Método Tomasevich

Miranda¹¹, formuló un método para determinar el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales y/o productos fitoterapéuticos frente a ADN genómico. Es necesario conocer ¿qué órgano de la planta? tallos, flores, hojas, frutos y/o semillas son usadas para preparar los remedios caseros y obtener el extracto de la misma, que puede ser acuoso, hidroalcohólico o con otro solvente orgánico; si se va estudiar el látex, se recomienda obtenerla directamente de la planta.

Preparar soluciones del extracto a diferentes concentraciones: 1 mg/mL, 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL; en caso del látex preparar diluciones a concentraciones de 1%, 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50% y 100 %. Por otro lado, obtener ADN genómico del organismo en estudio: humano, animal o microbiano, mediante extracción orgánica o kit comercial, procurando que el ADN sea íntegro, no fragmentado; seguidamente preparar un stock de 200 μ L a concentración de 1,500 ng/ μ L.

Para la evaluación de la genotoxicidad *in vitro* mediante la fragmentación del ADN, etiquetar una batería de 10 tubos de 500 μ L; depositar 14 μ L de ADN del stock en los tubos N° 1 al 7, luego agregar 6 μ L de cada una de las concentraciones del extracto o látex a los tubos correspondientes de 1 al 7; el tubo N° 8 se usa como “blanco”, depositando 14 μ L de extracto a 100 mg/mL o látex a 100% más 6 μ L de agua bidestilada; el tubo N° 9 se usa como “control”, colocando 14 μ L de ADN más 6 μ L de agua bidestilada; el tubo N° 10 se usa como “descarte de nucleasas”, colocando 14 μ L de ADN más 6 μ L de extracto a 100 mg/mL o látex a 100%, más 6 μ L de la enzima proteinasa K. Cada batería de tubos incubar en baño María a 37°C durante una hora y de ser necesario hasta cuatro horas. Estos productos del ensayo, además de un marcador de tamaño molecular (50 pb), se someten a electroforesis a 40 voltios durante tres horas en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1%, luego se visualizará en radiación de luz ultra violeta y se tomar el registro fotográfico. Estos registros fotográficos, revelan la actividad genotóxica mediante fragmentación del ADN de las siete concentraciones ensayadas; el “blanco” sirve para verificar que no exista ADN contaminante en el extracto o látex; el “control” se usa para comparar la cantidad de ADN sin tratamiento, respecto a los siete tubos que recibieron tratamiento; y el “descarte de nucleasas” para corroborar el efecto por acción de los metabolitos secundarios, mas no por la actividad de nucleasas, debido a que ellas fueron destruidas por acción de la proteinasa K en el periodo de incubación. El grado de fragmentación se compara por porcentaje, llevando a una escala numérica de cero a cuatro. El método Tomasevich, es eficaz y eficiente para determinar genotoxicidad de las plantas medicinales mediante fragmentación de ADN.

2.2.9 Ensayo cometa (EC)

Es un biomarcador rápido, simple, visual y sensible, conocido como electroforesis unicelular alcalina, que se utiliza para medir y analizar rupturas en

el ADN. Detecta diferencias intracelulares y daño en los procesos de reparación de virtualmente todas las células. La capacidad de migración del ADN depende de la cantidad de rompimientos producidos por el agente en cuestión de esta manera cada célula lesionada tiene la apariencia de un cometa con una cabeza y una cola brillante y fluorescente; las células que no han sido dañadas aparecen con núcleos intactos, sin cola.³⁹

Existen muchas versiones del ensayo cometa que se aplican constantemente en diferentes laboratorios a nivel mundial; la metodología general y estándar fue descrita por Ostling y Johanson en 1984 y luego reformada por Singh *et al.* En 1988, sin embargo, actualmente, se han dado a conocer distintas modificaciones a la técnica dependiendo de los intereses de estudio de algunos grupos de investigación.³⁹

2.2.9.1 Ventajas del Ensayo Cometa

El ensayo cometa o electroforesis de una sola célula provee ciertas ventajas ante otras pruebas que evalúan el daño genotóxico por efecto. En este test los datos son colectados a nivel de células individuales, proveyendo información de la distribución intercelular del daño y de la reparación. Así mismo se requiere sólo pequeños números de células para ser llevado a cabo y virtualmente cualquier población de células eucariotas puede ser utilizada en el proceso.³¹ Por medio de este ensayo es posible evaluar el daño en células no proliferativas, lo que representa también un gran beneficio sobre otras técnicas que si lo requieren.⁴⁰

En la electroforesis de una sola célula además se ha reportado mayor sensibilidad de detección de daño con respecto a otras pruebas de citogenética clásica. Estudios comparativos en donde se evalúan los efectos genotóxicos de la radiación por rayos X en linfocitos humanos, establecen que el daño se incrementa con las dosis de radiación proporcionadas a la muestra tanto en el test de micronúcleos como en el ensayo cometa, sin embargo, la sensibilidad del ensayo cometa es significativamente superior, puesto que el daño es detectado incluso a bajas exposiciones. El ensayo del cometa alcalino es considerado también en otros estudios comparativos de carácter farmacéutico para la evaluación de nuevas drogas, junto con la prueba de aberraciones cromosómicas, mostrando un alto grado de valor predictivo.⁴¹

A nivel general este test de genotoxicidad es bastante flexible permitiendo la detección de un amplio rango de daños que pueden ocasionarse en el ADN y

consta de un proceso sencillo y de rápida ejecución, por lo que es posible la obtención de resultados el mismo día en que se ha tomado la muestra y se ha realizado el protocolo.⁴¹

2.2.9.2 Desventajas del Ensayo Cometa

A pesar de que la técnica ha sido ampliamente empleada y aceptada a nivel mundial, existen algunas desventajas en su proceso de evaluación. La primera de ellas hace referencia al estricto manejo y preparación de los reactivos y el número de variables que pueden afectar un óptimo desarrollo, pues cualquier alteración en la concentración de la agarosa, el estado de las distintas soluciones de trabajo, el pH, la temperatura y los tiempos de cada paso, pueden cambiar drásticamente el resultado a analizar debido a la alta sensibilidad de la técnica. La segunda desventaja y la más nombrada, hace referencia a la falta de estandarización en el análisis de las muestras y la representación de los datos que se obtienen en los estudios, ya que, aunque muchos investigadores abarcan el tema, proponen constantemente nuevas formas de valoración, sin definir un único proceso de evaluación que permita la comparación entre laboratorios.⁴²

2.2.9.3 Aplicaciones

El ensayo cometa es una de las técnicas más empleadas en la actualidad dentro del área de la genética toxicológica. Por su método económico, rápido y efectivo, es empleado en el estudio de seguimiento a exposiciones medio ambientales y ocupacionales de poblaciones humanas. En las disciplinas medioambientales, por ejemplo, se han realizado estudios del impacto de genotóxicos en medios acuáticos usando como modelo biológico distintas especies de peces. Así mismo en el área clínica, se han adelantado estudios de Farmacovigilancia de distintas drogas de genotoxicidad de productos químicos de los que hacen parte incluso el empleo de determinados tipos de resina en la salud oral;³⁹ y estudios sobre mutágenos de línea germinal.⁴³

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, y el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

Sonchus asper (L.) Hill. “qasa isqana”, que crece en los diferentes lugares de la Ciudad Universitaria de la UNSCH, distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga, región Ayacucho.

3.2.2 Muestra

Especímenes de *Sonchus asper* (L.) Hill. “qasa isqana”.

3.2.3 Muestreo

Muestreo aleatorio simple de *Sonchus asper* (L.) Hill. “qasa isqana”, para la obtención directa del látex, en la Ciudad Universitaria de la UNSCH.²⁴

3.3 Unidad experimental

ADN genómico de *Staphylococcus aureus* a concentración de 1500ng/μL por cada ensayo.

3.4 Metodología y recolección de datos

3.4.1 Recolección de la muestra

Las muestras fueron recolectadas en la Ciudad Universitaria de la UNSCH, provincia de Huamanga de la región Ayacucho, luego se transportó al Laboratorio de Farmacognosia, y al Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, para el correspondiente estudio.

3.4.2 Obtención del látex de *Sonchus asper* (L.) Hill. “qasa isqana”.

El látex de *Sonchus asper* (L.) Hill “qasa isqana” se obtuvo realizando un corte en la parte basal de la planta, luego con la ayuda de una micropipeta de 10µL se recolectó en los tubos de eppendorf estériles de 200µL e inmediatamente se llevó la muestra al laboratorio, para el respectivo estudio.

3.4.3 Tamizaje fitoquímico del látex de *Sonchus asper* (L.) Hill. “qasa isqana”.

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa a los látex obtenidos de *Sonchus asper* (L.) Hill. “qasa isqana”, para determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios, que se fundamentan en los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas. Las reacciones de identificación, se realizarán siguiendo la metodología propuesta por Lock y Miranda.⁴⁴

3.4.4 Cultivo de *Staphylococcus aureus* y extracción de ADN genómico

Se realizó la reactivación y cultivo de la cepa de *Staphylococcus aureus*, en caldo Mueller Hinton y luego en Agar Mueller Hinton, con la finalidad de obtener una masa celular bacteriana y extraer el ADN genómico con el siguiente protocolo:

1. Se colocó 400µL de buffer TE 1X a un tubo eppendorf de 2mL y en ella se transfirió con un asa de kolle aproximadamente 100mg de masa celular del cultivo joven de *Staphylococcus aureus*, luego se procedió a la inactivación de las bacterias a 85°C por 25 minutos.
2. Se añadió 60µL de Lisozima (10mg/mL) y se incubó a 37°C por 2 horas en baño María.
3. Luego se añadió SDS/proteinasa K (75µL SDS 10% + 5µL PK 10mg/mL) y se incubó a 65°C por 15 minutos.
4. Se aumentó 100µL NaCl 5M más 5µL de CTAB (N-cetil-N,N,N-Trimetil bromuro de amonio) y se incubó a 65°C por 15 minutos.
5. Se agregó 750µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se homogenizó agitando suavemente con la mano durante cinco minutos y se centrifugó a 14000rpm por 15 minutos.
6. Luego de la formación de dos capas en el tubo eppendorf, se trasvasó cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo eppendorf.

7. Se agregó 600µL isopropanol helado al 100%, luego se llevó a incubación a – 20°C por una noche.
8. Se centrifugó a 14 000rpm por 15 minutos y se descartó el sobrenadante.
9. Se añadió 1 mL de etanol al 70%, se centrifugo a 14 000rpm por 10 min.
10. Se descartó el sobrenadante y se rehidrato el sedimento con 50µL de agua bidestilada estéril.
11. Se agregó 1µL ARNasa de 20mg/µL y se incubo a 37°C durante 1 hora.
12. Luego se guardó a – 20°C hasta su posterior análisis.

3.4.5 Ensayos de la genotoxicidad *in vitro*:

Se desarrolló siguiendo el “método Tomasevich” propuesto por Miranda¹¹; con las siguientes fases:

3.4.5.1 Fase de cuantificación y preparación de stock de ADN genómico obtenido para el ensayo

El ADN genómico obtenido de *Staphylococcus aureus*, será cuantifico por espectrofotometría UV marca Eppendorf BioPhotometer plus; luego se preparó un stock a concentración de 1500ng/µL en volumen final de 200µL, para cada ensayo en la investigación.

3.4.5.2 Fase de ensayo de genotoxicidad *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L.) Hill. “qasa isqana”, sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

Se preparó las soluciones del látex obtenido de *Sonchus asper* (L.) Hill “qasa isqana”, a concentraciones de 1%, 2.5%,5%,10%,25%,50% y 100% del látex de la planta, utilizando agua bidestilada estéril.

Así mismo, se usó como “blanco” el látex al 100%, como “control” 14µL de ADN más 6µL agua estéril y como “descarte de nucleasas”, un tubo con 14µL de ADN más 6µL de látex a 100% más 6µL de proteinasa K.

Se acondiciono las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro*, de acuerdo al detalle siguiente:

TABLA 1.

Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* del látex obtenido de *Sonchus asper* (L.) Hill “qasa isqana”, frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

Condiciones		Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>									
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
									Blanco	Control	PK
Stock de ADN (1 500 ng/µL)	Volumen en µL	14	14	14	14	14	14	14	-	14	14
Látex (%)	(%)	1	2.5	5	10	25	50	100	100	-	100
	(µL)	0.6	1.5	3	6	1.5	3	6	20	-	6
Proteinasa K		-	-	-	-	-	-	-	-	-	6
Agua bidestilada esteril		5.4	4.5	3	-	4.5	3	-	-	6	-
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20			20	20	26
Incubación en baño María a 37 °C		1 hora									

3.4.6 Fase de electroforesis para la detección de genotoxicidad

3.4.6.1 Procedimiento

- Se preparó el gel de agarosa a 1% y se dispuso en una cámara de electroforesis Biometra.
- Para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa, se utilizó las cantidades descritas en la siguiente tabla:

TABLA 2.

Preparación de soluciones para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa con soluciones de digestión de ADN de grupo 1 para el ensayo de genotoxicidad *in vitro* del látex obtenido de *Sonchus asper* (L.) Hill “qasa isqana”. Ayacucho 2018.

Condiciones		Volúmenes de carga para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>										
Nº de carril del gel		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Muestra	(mg/mL)	Marcador molecular	1	2.5	5	10	25	50	100	Blanco	Control	PK
	(µL)		4	8	8	8	8	8	8	8	8	8
H ₂ O _d (µL)		2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Loading (µL)		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Volumen total (µL)		7	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programó el corrido a 30 voltios (V) durante tres horas.⁴⁴

3.4.7 Fase de radiación UV para la visualización de genotoxicidad

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergió en el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante diez minutos aproximadamente, se enjuagó con agua corriente dos veces y para visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN productos de la genotoxicidad, se colocó en el gel en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*.⁴⁴

Adicionalmente se tomará fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.

3.4.8 Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad, visualizados en el registro fotográfico, son basados en la clasificación del “ensayo cometa” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma.⁴⁵

TABLA 3.

Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.

Clase	Genotoxicidad
0	fragmentación de ADN < 5%
1	fragmentación de ADN entre 5 a 20%
2	fragmentación de ADN entre 20 a 40%
3	fragmentación de ADN entre 40 a 95%
4	fragmentación de ADN > 95%

Fuente: Larrea

3.5 Tipo de investigación

Experimental.¹ Porque éste estudio reúne los dos requisitos para lograr el control y la validez interna: a) grupos de comparación (manipulación de la variable independiente), y b) equivalencia de los grupos.⁴⁶

3.5.1 Diseño de investigación

La investigación que realizamos fue un diseño con posprueba únicamente y grupo de control, que incluye dos grupos: uno recibe el tratamiento experimental

y el otro no (grupo de control). Es decir, la manipulación de la variable independiente alcanza solo dos niveles: presencia y ausencia. Cuando concluye la manipulación a ambos grupos se les administra una medición sobre la variable dependiente en estudio.⁴⁶

TABLA 4.

Diseño de investigación con posprueba únicamente y grupo de control.

GRUPOS	TRATAMIENTO	OBSERVACIÓN
G ₁	X	O ₁
G ₂	-	O ₂

Se realizaron cuatro repeticiones de cada ensayo.

3.6 Análisis de datos estadísticos

Los datos son agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para medir el porcentaje de fragmentación de más de dos muestras independientes, es decir concentraciones del látex en estudio. El valor de $p \leq 0,05$, se consideró como el nivel estadísticamente significativo Hernandez.²⁷

Para lo cual se planteó la siguiente hipótesis.⁴⁶

H₀ = No presenta efecto genotóxico.

H_i = Presenta efecto genotóxico.

IV. RESULTADOS

TABLA 5.

Metabolitos secundarios en el látex de *Sonchus asper* (L). Hill "qasa isqana". Ayacucho 2018.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Dragendorff	+++	Hay formación de precipitado de color anaranjado.
	Mayer	+++	Hay formación de precipitado de color blanco.
Flavonoides	Shinoda	+++	Hay una coloración de color naranja.
Taninos y Fenoles	Cloruro Férrico	+++	Formación de una coloración negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	++++	Coloración violeta
Cardenólidos	Kedde	++++	Hay coloración rojo violácea.

Leyenda:

++++ : Muy abundante
+++ : Abundante
++ : Regular
+ : Escaso

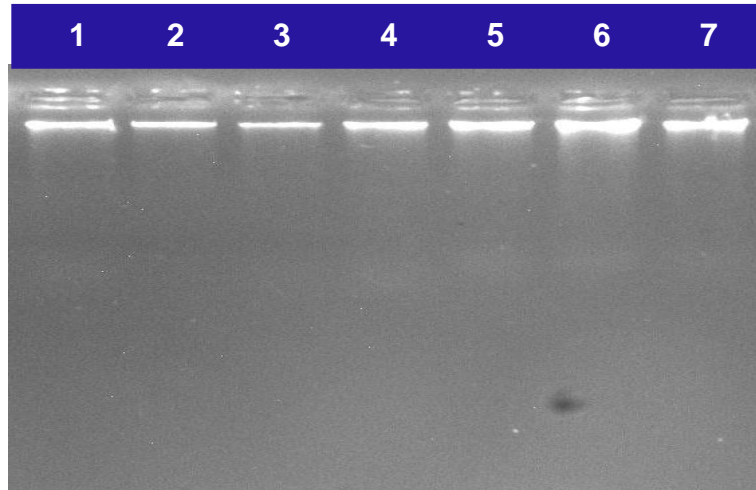


Figura N° 3. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* obtenido de siete muestras y coloreado con bromuro de etidio. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Leyenda:

Volumen de carga: Muestra 4 μ L + loading 6X 1 μ L + 7 μ L agua PCR.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante una hora.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante diez minutos.

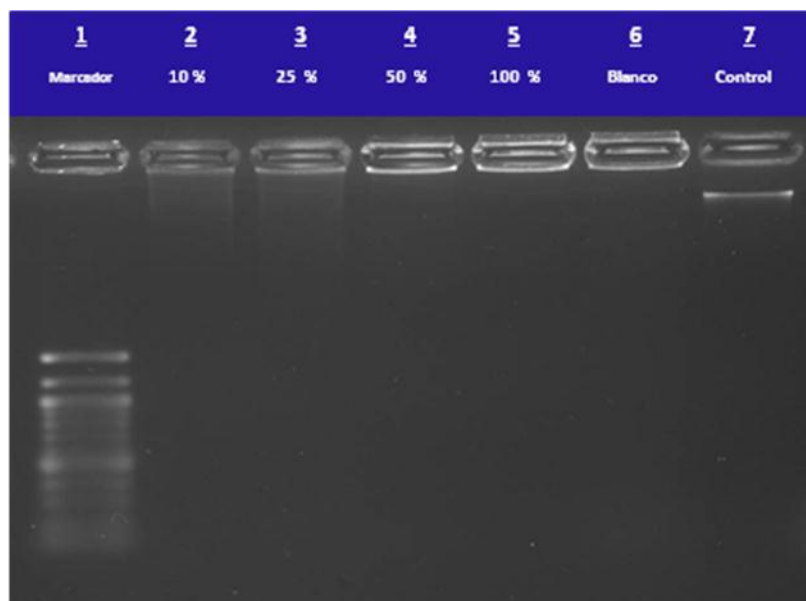


Figura 4: Ensayo preliminar de genotoxicidad *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus* incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Leyenda:

Carril N° 1: Marcador de Peso molecular

Carril N° 2: Con 10%

Carril N° 3: Con 25%

Carril N° 4: Con 50%

Carril N° 5: Con 100%

Carril N°6: Con 100% de látex (blanco)

Carril N° 7: Con 100% de ADN puro (control).

Volumen de carga: Muestra (8 μ L) + loading (1 μ L) + agua PCR (1 μ L) = 10 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.

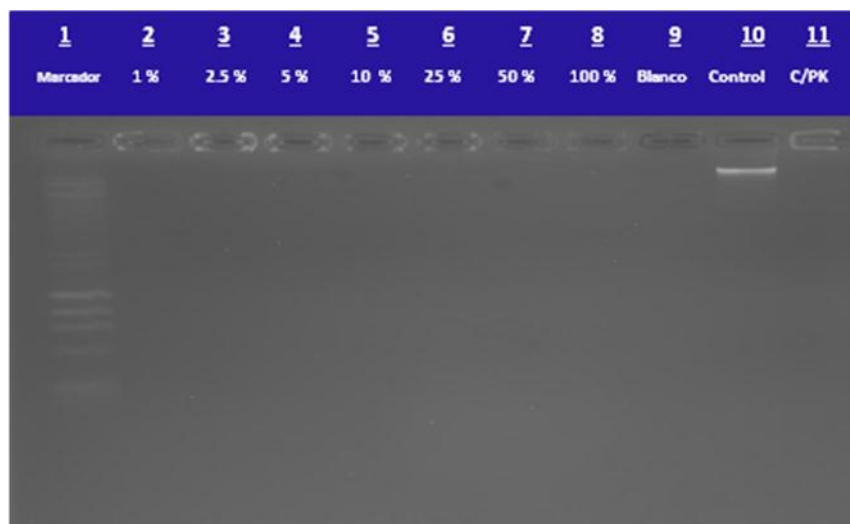


Figura 5: Ensayo genotóxico *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus* incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de peso molecular

Carril Nº 2: Con 1 %

Carril Nº 3: Con 2.5 %

Carril Nº 4: Con 5 %

Carril Nº 5: Con 10 %

Carril Nº 6: Con 25 %

Carril Nº 7: Con 50 %

Carril Nº 8: Con 100 %

Carril Nº 9: Con 100 % de látex (blanco).

Carril Nº 10: Con 100% de ADN puro (control).

Carril Nº 11: Con 100 % de látex + proteinasa K

Volumen de carga: Muestra (8 µL) + loading (1 µL) + agua PCR (1 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.



Figura 6: Reproducibilidad del ensayo genotóxico *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus* incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Leyenda:

Carril Nº 1: Marcador de peso molecular

Carril Nº 2: Con 1 %

Carril Nº 3: Con 2.5 %

Carril Nº 4: Con 5 %

Carril Nº 5: Con 10 %

Carril Nº 6: Con 25 %

Carril Nº 7: Con 50 %

Carril Nº 8: Con 100 %

Carril Nº 9: Con 100 % de látex (blanco).

Carril Nº 10: Con 100% de ADN puro (control).

Carril Nº 11: Con 100 % de látex + proteinasa K

Volumen de carga: Muestra (8 µL) + loading (1 µL) + agua PCR (1 µL) = 10 µL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.

TABLA 6

Valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus* incubado a 37°C durante una hora. C.I.B.M.B.-UNSCH. Ayacucho 2018.

Condiciones de la incubación		<i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana”						
		Látex.						
Temperatura °C	Tiempo Hora	Concentración en %.						
		1	2.5	5	10	25	50	100
37	1	4	4	4	4	4	4	4
		4	4	4	4	4	4	4
		4	4	4	4	4	4	4
		4	4	4	4	4	4	4

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación conduce a interpretar los resultados de los diferentes ensayos, con el propósito determinar el efecto genotóxico “*in vitro*” del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”.

La tabla 5, es el resultado de la identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios en el del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”, reportando la presencia de aminos (aminoácidos) y cardenólidos en cantidad muy abundante; alcaloides, flavonoides, taninos y fenoles en cantidad abundante.

Florence y Col¹², reportaron los resultados del estudio fitoquímico de los extractos con acetona, metanol y agua de las hojas de *Sonchus asper* y *Sonchus oleraceus*. El análisis mostró que las plantas contenían un porcentaje apreciable de humedad, ceniza, proteína cruda, lípido crudo, fibra cruda e hidratos de carbono. También son ricas en flavonoides, flavonoles, proantocianidinas, fenoles totales y bajos niveles de saponinas, fitato y alcaloides.

Rahmat A. y Col¹⁶ también estudiaron *Sonchus asper* usado tradicionalmente como medicina popular para tratar trastornos mentales en Pakistán. Su estudio demostró el efecto de la fracción metanólica rica en polifenólicos de *Sonchus asper* sobre el rendimiento cognitivo, las actividades antioxidantes del cerebro y la actividad de la acetilcolinesterasa en ratas macho.

Nuestros resultados, son similares a los reportados por Montes y col¹⁷ en el tamizaje fitoquímico del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” en la que identificaron la presencia de fenoles y taninos en cantidad abundante y alcaloides en cantidad leve. Así mismo, Montes y col¹⁸ reporta el tamizaje fitoquímico del látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”, identificando la presencia de alcaloides, fenoles y taninos en cantidad abundante, y lactonas y/o cumarinas en cantidad leve.

Son estos metabolitos secundarios presentes en el látex de las diferentes especies estudiadas, las que estén ejerciendo el efecto genotóxico sobre el ADN genómico del microorganismo estudiado.

La figura 3, es el registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, mostrando los ADN genómicos obtenidos de siete cultivos de *Staphylococcus aureus*, la fluorescencia del bromuro de etidio nos revela la concentración y la nitidez de las bandas, que muestran la integridad del ADN genómico, es decir no está fragmentado; quedando aptas para la realización de los ensayos de genotoxicidad “*in vitro*”.

La fotografía de la figura 4, corresponde al primer ensayo genotóxico *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus*., incubado a 37°C durante una hora, observándose que a concentraciones de 10, 25, 50 y 100% (carriles 2, 3, 4, y 5, respectivamente), el ADN ha sido fragmentado en su totalidad, contrastando con el ADN del carril 7 que funciona como “control” y también comparado con el carril 1, que corresponde al marcador de tamaño molecular. El carril 6 corresponde al “blanco” no se observa ninguna banda, para revelarnos que en el extracto puro, no hay presencia de ADN. Estos resultados, que revelan una potente actividad genotóxica del látex en estudio, nos conduce a formular otros ensayos con el látex a menores concentraciones

La figura 5, corresponde a la fotografía del ensayo genotóxico *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus*., incubado a 37°C durante una hora, a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100% de látex (en los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente), observándose la ausencia de bandas de ADN, comparando con la refringencia del ADN “control” del carril 10; el carril 11 corresponde al tratamiento del látex con proteinasa K, para confirmar el efecto genotóxico frente al ADN, visualizándose la degradación total del ADN; todos los carriles, igualmente, pueden ser comparados con las bandas del marcador de tamaño molecular que ha corrido en el carril 1. En el carril 9 no hay banda, indicando que en el látex puro, no hay presencia de ADN.

Los resultados anteriores, son ratificados en la figura 6, que corresponde a la fotografía del ensayo genotóxico *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus*., incubado a 37°C durante una hora, a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100% de

látex (en los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 respectivamente), observándose la ausencia de bandas de ADN, comparando con la refringencia del ADN “control” del carril 10; el carril 11 corresponde al tratamiento del látex con proteinasa K, para confirmar el efecto genotóxico frente al ADN, visualizándose la degradación total del ADN; todos los carriles, igualmente, pueden ser comparados con las bandas del marcador de tamaño molecular que ha corrido en el carril 1. En el carril 9 no hay banda, indicando que en el látex puro, no hay presencia de ADN. La tabla 6, reporta los valores numéricos del ensayo genotóxico *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100 %, respectivamente, frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus* incubado a 37°C durante una hora; en todos los casos se asigna la clase 4, tomando como referencia lo expresado en la tabla 3 de la clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual, porque la fragmentación de ADN genómico de *Staphylococcus aureus* fue mayor al 95%. Por lo tanto tomando estos datos no se pudo realizar el análisis estadístico con la prueba de Kruskal – Wallis, porque no permiten realizar pruebas estadísticas de análisis de varianza, todos tienen el mismo resultado, no existe variabilidad a razón de la concentración del látex en el efecto genotóxico frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*. A partir de la concentración de 1.0% de látex, ha fragmentado más del 95% del ADN, así se incrementa la concentración del látex, el resultado será el mismo. Se sugiere realizar ensayos a concentraciones menores de 1.0%. Si se podría estudiar el efecto genotóxico con las mismas concentraciones, a razón del tiempo para que ocurra la fragmentación total del ADN; podría ser que a menor concentración demore más tiempo que cuando se trata con mayor concentración.

Florence y Col¹², reportaron que los extractos de *Sonchus asper* y *Sonchus oleraceus*, presentan fuertes propiedades antioxidantes; así mismo, los extractos con acetona y metanólico de *Sonchus asper*, presentaron actividad antibacteriana frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus kristinae*, *Streptococcus pyrogens*, *Escherichia coli*, *Salmonella pooni*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

Por otro lado, Rahmat A. y Col.¹³ demostraron que *Sonchus asper* posee propiedades evidentes efectos hepatoprotectores, y Muhammad R. y Col¹⁵ realizaron estudios de efectos protectores del extracto de metanol de *Sonchus*

asper contra el daño oxidativo inducido por KBrO_3 en tejidos cardíacos de rata, se determinaron en este estudio que el mismo tratamiento revirtió respuestas de forma dependiente de la dosis, parece probable que el extracto de metanol de *Sonchus asper* pueda proteger los tejidos cardíacos contra el daño oxidativo mediado por KBrO_3 .

Nuestros resultados revelan que, el látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”, presenta una potente actividad genotóxica “*in vitro*”, sumándose una propiedad fitoterapéutica más de ésta planta de uso medicinal, cuyo efecto atribuimos a la actividad realizada por los metabolitos secundarios presentes en el látex de ésta planta; los mismos que son similares a las plantas cercanas filogenéticamente, reportados por Montes y Col¹⁷, estudió el efecto genotóxico *in vitro* del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” frente a ADN genómico humano, el látex a concentraciones de 10% y 25%, han fragmentado entre 40% a 95% del ADN, mientras que el látex a 50% y 100 % han fragmentado totalmente al ADN genómico humano. La prueba de Kruskal Wallis ($p=0,027$), permitió determinar que sí existe diferencia en la actividad genotóxica del látex, según su concentración. Concluyeron que el látex de *Taraxacum officinale* “diente de león”, presenta un efecto genotóxico importante frente a ADN genómico humano. Así mismo, Montes y col¹⁸ realizó un estudio para determinar la genotoxicidad *in vitro* del látex de una planta medicinal de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” frente a ADN genómico humano, el látex a concentraciones de 10%, 25%, 50% y 100 %, fragmentaron totalmente al ADN genómico humano; no existe diferencia en la actividad genotóxica del látex, según su concentración. Concluyeron que el látex de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”, presenta un efecto altamente genotóxico frente a ADN genómico humano.

Por otro lado, Moreno y Col¹⁹ estudiaron el efecto genotóxico *in vitro* de una planta medicinal antiverrucoso *Euphorbia peplus* L. “leche leche” frente a ADN genómico humano, los resultados de los corridos electroforético revelaron que el látex a concentraciones de 5%, 10%, 25%, 50% y 100 %, han fragmentado totalmente al ADN genómico humano. Los tiempos de incubación según Mann-Whitney ($p=0,539$) no influye en la genotoxicidad del látex de “leche leche”, pero sí la concentración del látex, Kruskal-Wallis ($p=0,000$). Concluyeron que el látex de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” presenta un efecto altamente genotóxico frente a ADN genómico humano.

Moreno y Col²⁰ reportan un estudio de evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. “papaya”, frente a ADN genómico humano; los corridos electroforéticos, revelan que las siete concentraciones ensayadas de 1% al 100% de látex fresco, fragmentaron totalmente al ADN genómico humano; mientras que las concentraciones de 10%, 25% y 50% de látex cristalizado, han fragmentado entre 20% al 40% del ADN y a concentración de 100% de látex cristalizado degradado entre el 40% al 95% del ADN genómico humano, demostrando que la genotoxicidad del látex cristalizado si depende de su concentración. El tubo que contenía látex fresco al 100%, proteinasa K y ADN, también muestra fragmentación total del ADN, corroborando que este efecto fue por acción de los metabolitos secundarios, mas no por la actividad de nucleasas que podrían estar presentes en el látex, debido a que ellas fueron destruidas por acción de la proteinasa K en el periodo de incubación. Concluyeron que el látex fresco de *Carica papaya* L. “papaya” presentan una potente actividad genotóxica frente a ADN genómico humano, mientras que la de látex cristalizado, depende de su concentración.

Por tanto, estos efectos genotóxicos pueden obedecer a la presencia de una mixtura de metabolitos secundarios presentes en el látex de las plantas medicinales, específicamente en *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”, se encontraron aminos (aminoácidos) y cardenólidos en cantidad muy abundante, y alcaloides, flavonoides, taninos y fenoles, en cantidad abundante. Así mismo, queda descartada la posibilidad que la actividad genotóxica fuera por efecto de las nucleasas; porque al ser tratado el látex con la enzima proteinasa K, las nucleasas fueron destruidas por acción de la proteinasa K en el periodo de incubación de los ensayos realizados.

VI. CONCLUSIONES

- El látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” presenta efecto genotóxico *in vitro* sobre el ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.
- Los metabolitos secundarios identificados en látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”, fueron aminas (aminoácidos) y cardenólidos en cantidad muy abundante; y, alcaloides, flavonoides, taninos y fenoles, en cantidad abundante.
- El látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100%, respectivamente, presentó un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico de *Staphylococcus aureus*.

VII. RECOMENDACIONES

- Impulsar trabajos de investigación sobre genotoxicidad en la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ya que en los últimos años ha retornado el interés por las plantas medicinales en búsqueda de nuevas estructuras bioactivas para el tratamiento de las enfermedades.
- Ampliar estudios de genotoxicidad *in vitro* de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” con látex y extractos con otros solventes orgánicos, así como con extractos fraccionados y otras técnicas.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Gil O, Carmona A, Rodríguez A. Estudio Etnobotánico de especies tóxicas, ornamentales y medicinales de uso popular, presentes en el Jardín de Plantas Medicinales “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Los Andes; 2006
2. Carballo A, Cortada C, Gadano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Citogenética humana y genética toxicológica. Departamento de Bioquímica clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires. Argentina. 2005, 14 (2): 95-108.
3. Prieto J. Gomez L. Género *Staphylococcus*. Microbiología Médica. Editorial Doyma. 1996. Pág. 179-191.
4. Florence O, Jimoh A, Adedapo A. y Afolayan J. Comparación del valor nutritivo, antioxidante y antibacteriano de la actividad de *Sonchus asper* y *Sonchus oleraceus*. BMC Medicina complementaria y alternativa. El diario oficial de la Sociedad Internacional de Investigación de Medicina Complementaria (ISCMR) 2011; 12: 29-42. URL disponible en: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-29-42>.
5. Dusinska M, Andrew R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*; 2005.
6. Angelis K; Dusinska M; Collins A. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*; 2004
7. Lecca L, Cárdenas D, Yábar C. “Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y ADN”. Serie de normas técnicas N° 38. División de Biología Molecular Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima-Perú, 2003.
8. Cemeli E, Baumgartner A, Anderson D. Antioxidants and the Comet assay. *Mutation Research*; 2009.
9. Fairbairn D, Olive P, O'Neill K. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*; 1995
10. Arrebola D.; Fernández L. Actualización Sobre el Ensayo Cometa y de Micronúcleos *In vitro*, 2003.
11. Zúñiga L. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. [Tesis doctoral]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y microbiología. Grupo de Mutagénesis; 2009.

12. Rahmat A, Muhammad R, Sumaira S. y Mushtaq A. Evaluación del contenido fenólico y antioxidante de la actividad de varios extractos solventes de *Sonchus asper* (L) Hill. BMC Medicina complementaria y alternativa. El diario oficial de la Sociedad Internacional de Investigación de Medicina Complementaria (ISCMR)2012; **12** : 181.<https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-181>
13. Rahmat A, Muhammad Rashid K, Sumaira S y Jasia B, Prevencion de la nefrotoxica inducida por tetracloruro de carbono con *Sonchus asper* (L) Hill en ratas. BMC Medicina complementaria y alternativa. El diario oficial de la Sociedad Internacional de Investigación de Medicina Complementaria (ISCMR) 2010; 06:016. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.016>.
14. Muhammad R, Javeria H, Rahmat A, Jasia B, Maria S y Umbreen R. Prevención de la cardiotoxicidad inducida por KBrO₃ por *Sonchus asper* (L) Hill en ratas. BMC Medicina complementaria y alternativa. El diario oficial de la Sociedad Internacional de Investigación de Medicina Complementaria (ISCMR) 2011; 18: 011. <https://doi.org/11.1186/2011.18.011>
15. Rahmat A, Muhammad R y Sumaira S. Marcadores antioxidantes cefalorraquídeos, rendimiento cognitivo y actividad acetilcolinesterasa en ratas: eficiencia del *Sonchus asper* (L) Hill. BMC Medicina complementaria y alternativa. El diario oficial de la Sociedad Internacional de Investigación de Medicina Complementaria (ISCMR) 2012; 8: 21. <https://doi.org/10.1186/1744-9081-8-21>
16. Montes Mary, Miranda Tomás, Moreno Miriam, Rivera Jime, Tinco Aldo. Efecto genotóxico *in vitro* del látex de *Taraxacum officinale* “diente de león” frente a ADN humano. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Octubre 25 al 28 de 2017. Durango, Dgo. México.
17. Montes Mary, Miranda Tomás, Moreno Miriam, Rivera Jime, Sayas Yari. Genotoxicidad *in vitro* del látex de una planta medicinal de uso dérmico *Argemone mexicana* L. “cardo santo” frente a ADN genómico humano. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Octubre 25 al 28 de 2017. Durango, Dgo. México.
18. Moreno Miriam, Miranda Tomás, Pillaca Lizbeth, Aguilar Enrique, Rivera Jime. Efecto genotóxico *in vitro* del látex de una planta medicinal antiverrucoso *Euphorbia peplus* L. “leche leche” frente a ADN genómico

- humano. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Octubre 25 al 28 de 2017. Durango, Dgo. México.
19. Moreno M., Miranda T., Quispe C., Rivera J. y Ango H. Evaluación de la genotoxicidad *in vitro* de látex fresco y cristalizado de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano. 2^{do} Congreso Latinoamericano de Farmacogenómica y Medicina Personalizada. Octubre 25 al 28 de 2017. Durango, Dgo. México.
 20. Aucasime L. Herbario Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, 2017.
 21. Bravo Díaz, Luis. Farmacognosia. España: Editorial Elsevier: 2006.
 22. Kuklinski, C. Farmacognosia: aceites esenciales. 1^{ra} reimpresión. Barcelona: ediciones Omega, S.A. 2003.
 23. Chalar R. Moya J. Vargas E. Función Antimicrobiana de *Sonchus asper* (L.) Hill en cultivos de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Universidad Mayor de San Simón. Facultad de Medicina Aurélio Melean Cochabamba. Bolivia. [Revista en internet]. 2014. [Acceso mayo 2017]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?Script=sci_arttext&pid=S1817-74332014000100008
 24. Ruiz E. Epidemiología molecular y resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus aureus* en centros sanitarios de mallorca durante los últimos 15 años 1999-2013. [TESIS DOCTORAL].Universitat de les Illes Balears.2015
 25. Repetto Jiménez M, Repetto Kuhn G. Toxicología fundamental. 4^{ta} Edición. Madrid: Díaz de Santos; 2009.
 26. Glosario de términos Toxicológicos. Asociación Española de Toxicología
 27. Klaassen C, Watkins J, Casarett, Doull. Fundamentos de toxicología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2005.
 28. Herrera F, De La Peña E. Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Evolución de mutagenicidad y genotoxicidad. Madrid; 2004.
 29. Sanchez A, Fonseca G, capiro N, fernandez D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en cuba. Revista cubana en farmacia. 34, 34-43.2000.
 30. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid:Díaz de Santos; 2001

31. Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).Curso de Toxicología Ambiental. Bogotá (Colombia); 2011.
32. Carballo M. Centro de Análisis Programas Sanitarios (CAPS). Biomarcadores de genotoxicidad. Barcelona Universidad de Buenos Aires, 2011.
33. Klaassen C, Watkins J, Casarett, Doull. Fundamentos de toxicología. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, 2005.
34. Bello J, López A. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Díaz de Santos; 2001.
35. Lodish, Berk, Matsudaria, Káiser. Biología celular y molecular. 5^{ta} edición. Argentina: Médica panamericana. 2005
36. Primo, E. Química orgánica básica y aplicada de la molécula a la industria. Tomo II. España: Reverte, 2007.
37. Burriel Coll. “Estructura y propiedades de los ácidos nucleicos”. Master en Ingeniería Biomédica; 2007
38. Dahm R “Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research”. Human Genetics; 2008.
39. Álvarez C, Ochoa S, Ayala N, Andrade M. Prueba Cometa. Universidad de Guadalajara (México); 2001-2013.
40. Collins A. Workshop on single cell gel electrophoresis (the comet assay) held as part of the UKEMS/DNA repair network joint meeting. Swansea, March. Mutagenesis; 2005.
41. Monteith D; Vanstone J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage; 2003
42. Frenzilli G, Nigro M, Lyons B. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutation Research;2009
43. He J, Chen W, Jin L, Jin H. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. Mutation Research; 2000.
44. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular – Guía de Práctica. Edit. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
45. Larrea M, Tirado N, Ascarrunz E. Daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del Municipio de Luribay. BIOFARBO.
46. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 5^{ta} edición. Perú: Editorial Mc Graw Hill. 2010.

ANEXOS

Anexo 1. Clasificación taxonómica de *Sonchus asper* (L.) Hill. "qasa isqana"
.Ayacucho 2017.



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE
"SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA"

C E R T I F I C A

Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Roxana, HUAMÁN DE LA CRUZ,
ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación
de Cronquist, A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ASTERIDAE
ORDEN	:	ASTERALES
FAMILIA	:	ASTERACEAE
GENERO	:	Sonchus
ESPECIE	:	<i>Sonchus asper</i> (L.) Hill.
N.V.	:	"qasa isqana"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para
los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 21 de junio del 2017

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM HUAMANGENSIS

Tigo Lauri Rucastine Medina
JLPE

Anexo 2. Descripción botánica de *Sonchus asper* (L.) Hill. "qasa isqana"
.Ayacucho 2017.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE QASA ISQANA

Nombre científico : *Sonchus asper* (L.) Hill.
Nombre vulgar : "qasa isqana"
Familia : Asteraceae

CARACTERÍSTICAS:

Es una planta herbácea anual, con abundante látex de color blanco lechoso, las hojas son simples, sésiles, con lóbulos irregulares, de bordes dentados, glabras, de disposición alterna, siendo las hojas basales más grandes y con las vainas que abrazan al tallo (hojas envainadoras).

Las inflorescencias se presentan formando numerosas cabezuelas ó capítulos; rodeadas por un involucre formado por varias hileras de brácteas verdosas, las flores son pequeñas de color amarillo tenue o blanquecino, heteroclamídeas, pentámeras y bisexuales. Cáliz modificado en vilano formado por un penacho de pelos finos y blanquecinos; corola ligulada formado por 5 pétalos soldados en la base formando un tubo y se prolongan en una sola pieza a manera de una lengüeta; 5 estambres sinandro o sinanterio con los filamentos libres y anteras soldadas; ovario ínfero bicarpelar, unilocular y uniseminado. Fruto seco indehisciente del tipo aquenio provisto por un penacho de pelos blanquecinos (vilano), que le sirve como medio de dispersión por el viento.

HÁBITAT Y DISTRIBUCIÓN:

Es una especie originaria de Europa, crece en forma silvestre en costa, sierra y selva como maleza en los cultivos, terrenos abandonados huertos y jardines, generalmente en zonas húmedas. Se encuentra en todas las estaciones del año, de preferencia en época lluviosa donde florece y fructifica. Se propaga mediante semillas.

USOS:

En medicina popular se usa la planta en infusión ó como extracto para cólicos hepáticos y renales, como depurativo de la sangre, como antiespasmódico y otros; También se utiliza como alimento, consumiendo las hojas como hortalizas.

Ayacucho, 21 de Junio del 2017.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SALUD Y CIENCIA DEL AYACUCHO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERNÁNDEZ

E. L. Lucero
JEFE

Anexo 3. Clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus*



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOINFORMÁTICA

EL QUE SUCRIBE:

RESPONSABLE DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOINFORMÁTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA,

DA CONSTANCIA:

Que, la señorita **Roxana HUAMÁN DE LA CRUZ**, egresada de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de ésta Casa Superior de Estudios, ha solicitado la dación de una cepa bacteriana, para efectos de realizar su trabajo de tesis.

Tomada la muestra del cepario de éste Centro de Investigación y realizado las pruebas bioquímicas, se ratifica en la identificación, que corresponde a la siguiente determinación taxonómica según Rosenbach (1984):

TAXONOMIA DE *Staphylococcus aureus*

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Género	Staphylococcus
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i> .
Nombre común	"estaphylococos"

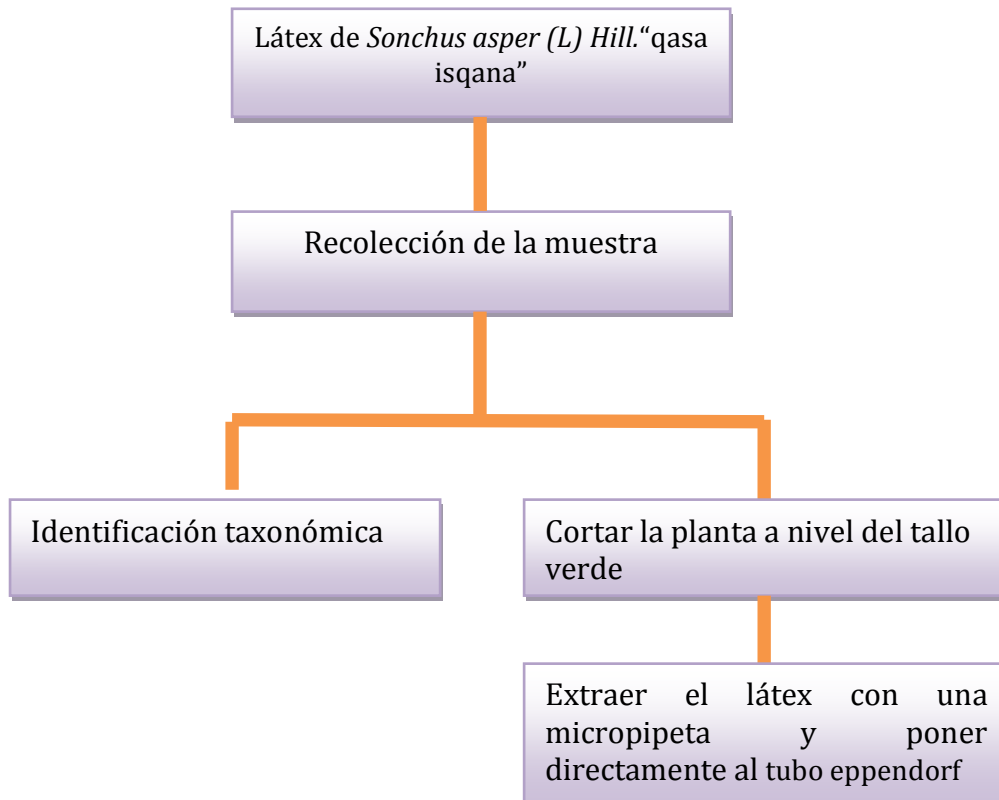
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines pertinentes.

Ayacucho, 15 de marzo de 2018.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTOBAL DE HUAMANGA
Facultad de Ciencias Biológicas
[Firma]
Tomás Óscar Miranda Tomasevich
Biólogo-Microbiólogo
C.B.P. 1969

Anexo 4. Diagrama para la obtención del latex de *Sonchus asper* (L.) Hill. "qasa isqana". Ayacucho 2018.



Anexo 5: Recolección y obtención del látex del *Sonchus asper* (L.) Hill. “qasa isqana”. Ayacucho 2018.



**Recolección de la muestra
Sonchus asper (L.)**

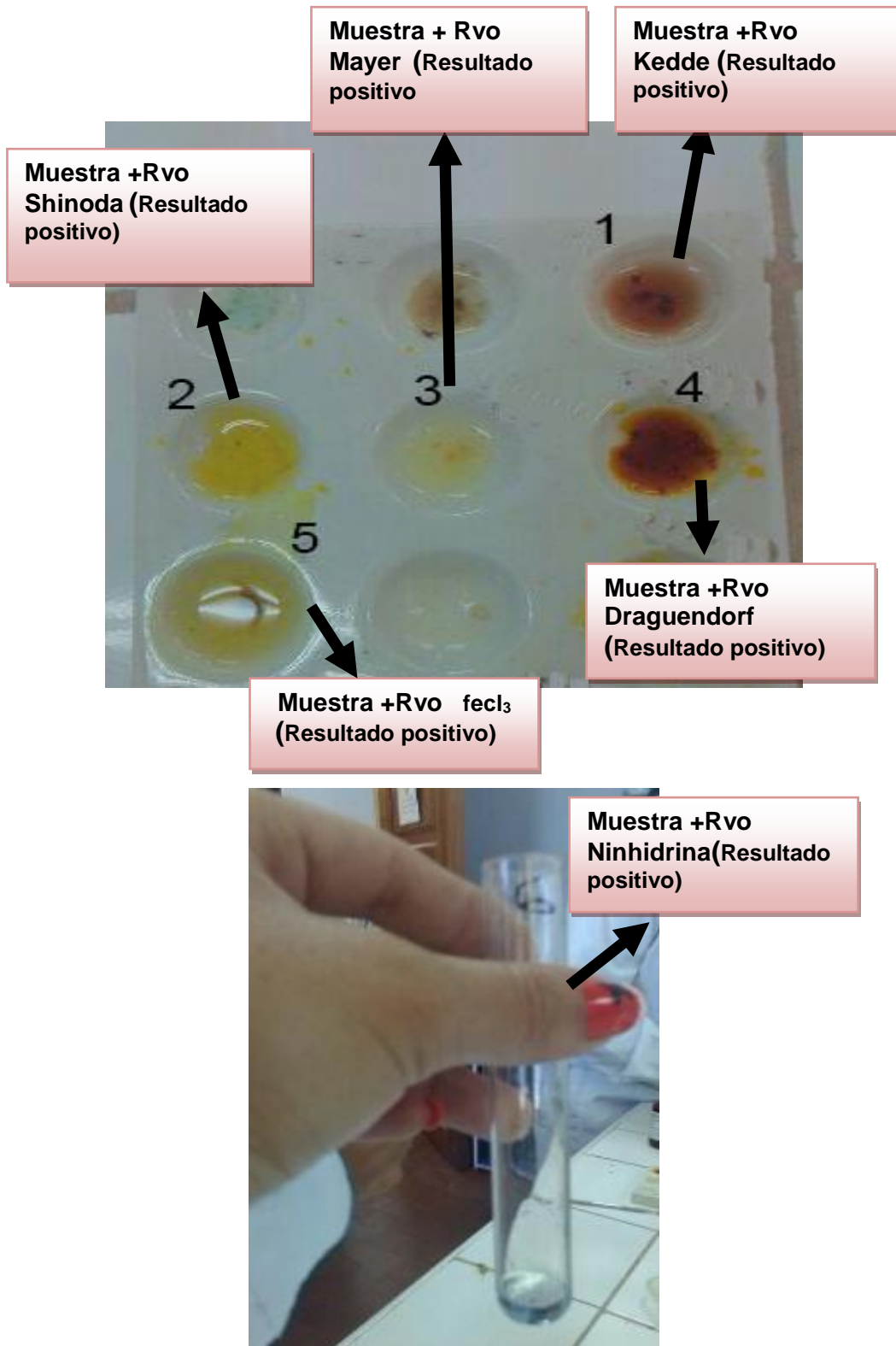


Obtención del látex

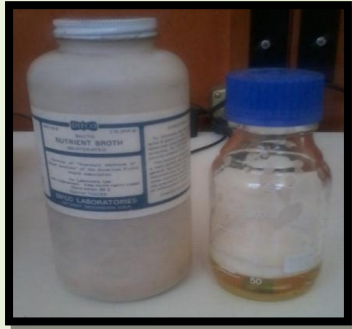


Látex

Anexo 6: Metabolitos secundarios encontrados en el latex del *Sonchus asper* (L.) Hill. "qasa isqana". Ayacucho 2018.



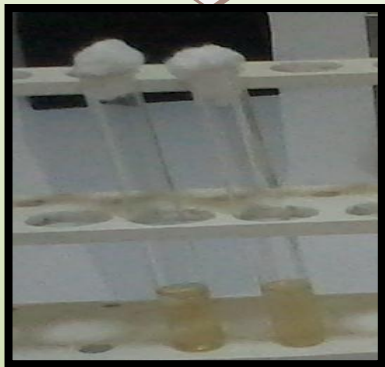
Anexo 7: proceso de cultivo de *Staphylococcus aureus* Ayacucho 2018



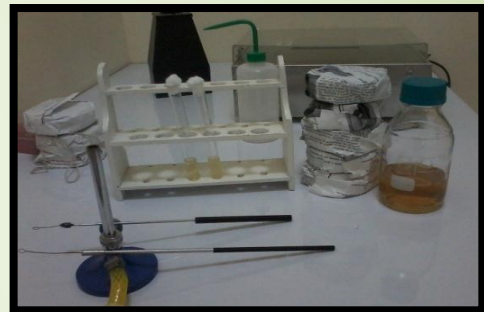
Preparación del caldo Mueller Hinton para reactivación de la cepa bacteriana y llevar al autoclave.



Preparación del Agar Mueller Hinton para el cultivo de la cepa bacteriana y llevar a la autoclave.



Poner en tubos de ensayo esterilizado llevar a la estufa a 37°C por 24 horas.

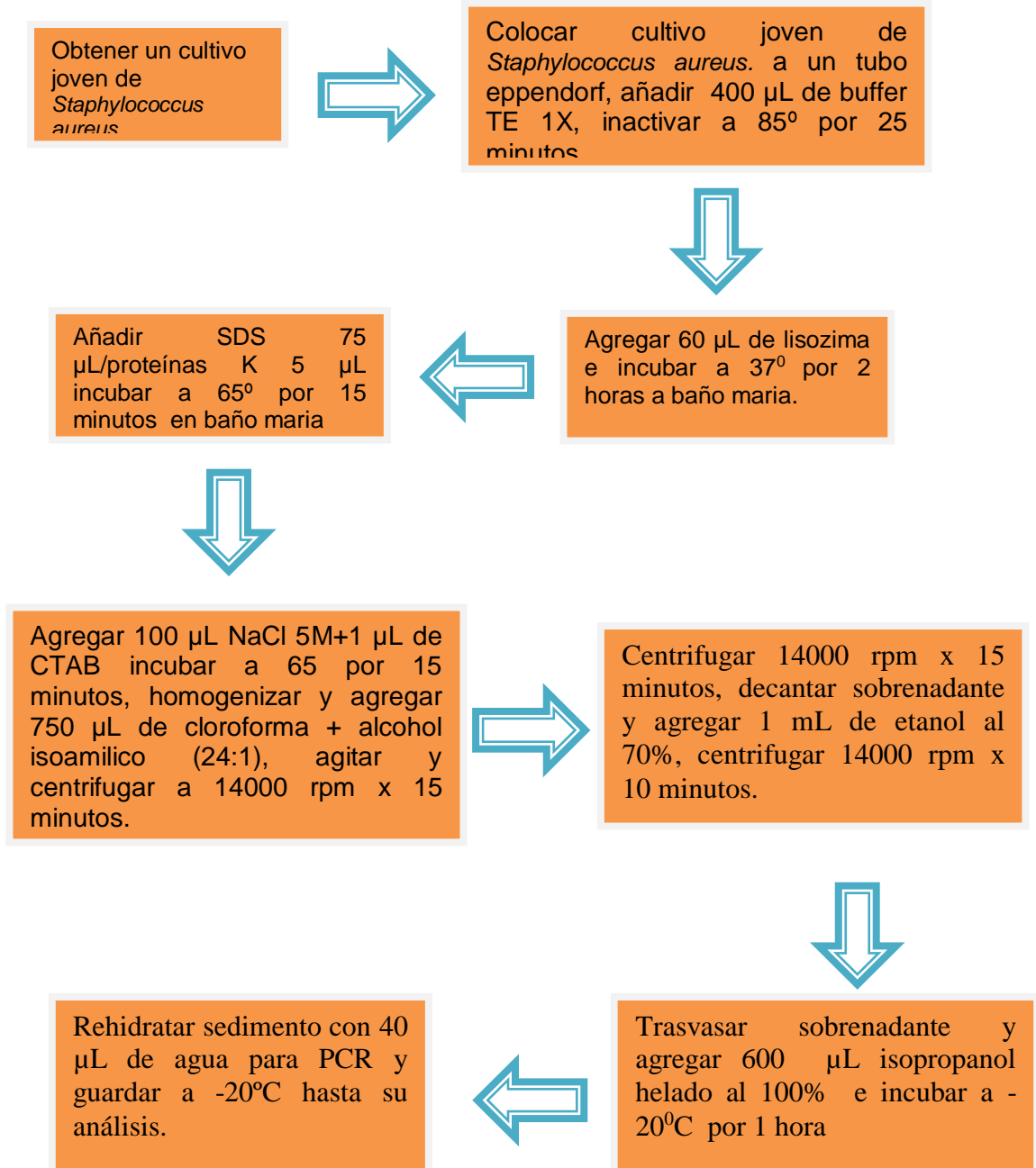


Cultivar la cepa bacteriana en placas petri, luego llevara la estufa a 37°C por 24 horas.



Cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*

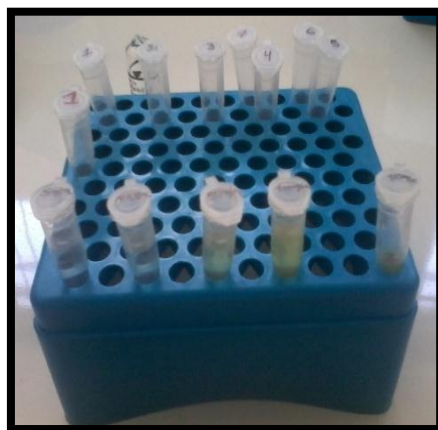
Anexo 8: Proceso de extracción de ADN genómico de *Staphylococcus aureus* Ayacucho 2018.



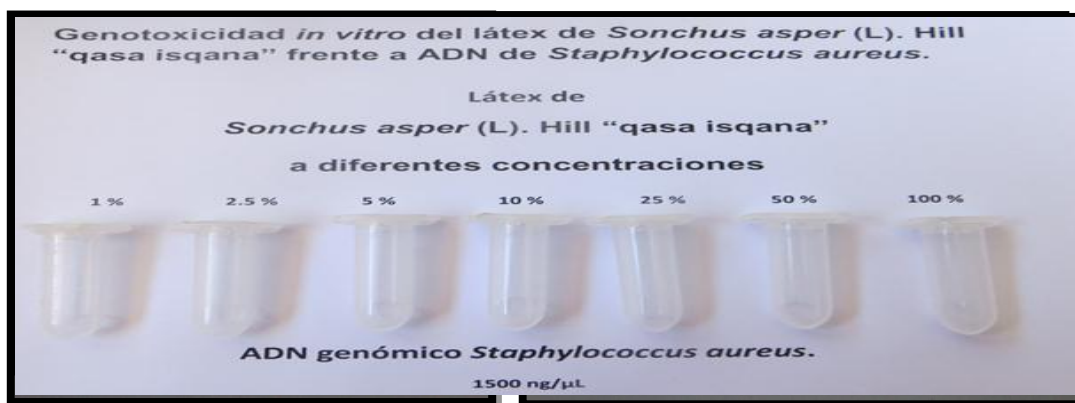
Anexo 9: Proceso de preparación a diferentes concentraciones el látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”. Ayacucho 2018



Extracción directa del látex de la planta en un tubo eppendorf

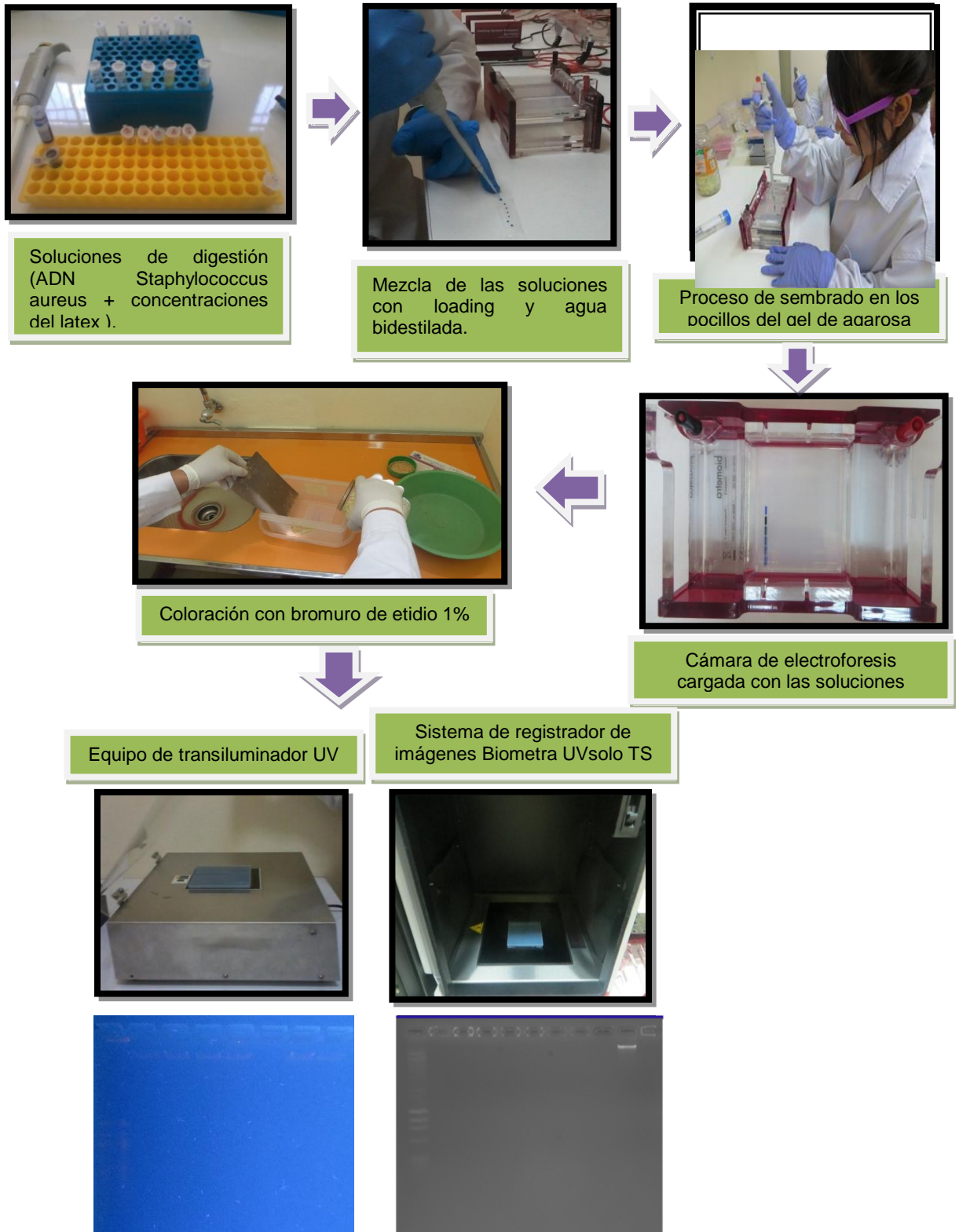


Proceso de dilución con H₂O_(d)

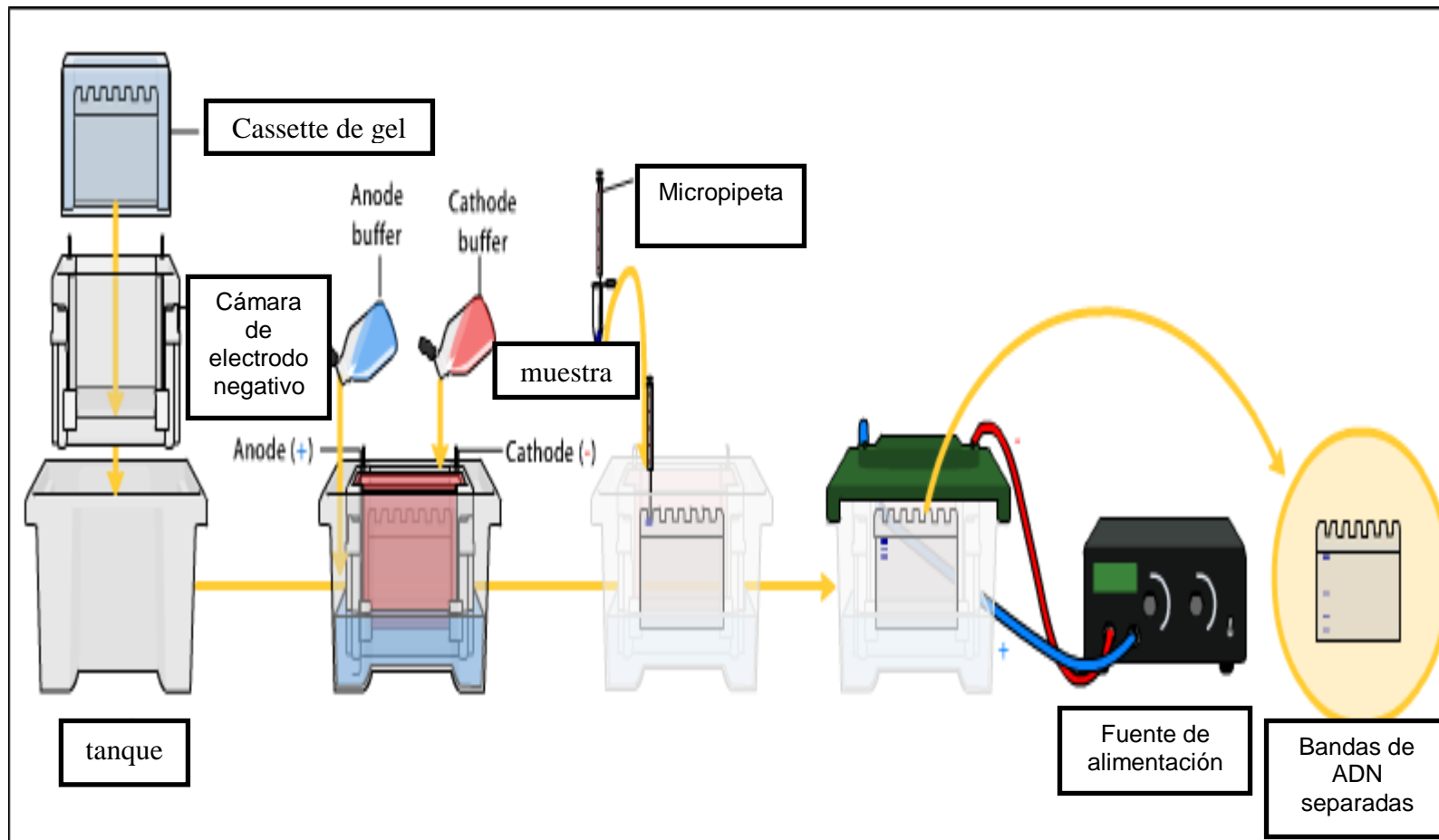


Concentraciones del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana”

Anexo 10: Proceso para la determinación del efecto genotóxico del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” frente a ADN genómico de *Staphylococcus aureus*. Ayacucho 2018.



ANEXO 11: Diagrama de flujo de electroforesis.



Anexo 12: Matriz de consistencia

TÍTULO: Genotoxicidad *in vitro* del látex de *Sonchus asper* (L). Hill “qasa isqana” frente a ADN de *Staphylococcus aureus*. Ayacucho, 2017.

PERSONAL INVESTIGADOR: Roxana HUAMÁN DE LA CRUZ

PROBLEMA	OBJETIVO	HIPÓTESIS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES	METODOLOGÍA
¿Tendrá efecto genotóxico <i>in vitro</i> el látex de <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana” frente a ADN de <i>Staphylococcus aureus</i> ?	<p>GENERAL Determinar la genotoxicidad <i>in vitro</i> del látex de <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana”.</p> <p>ESPECÍFICOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> Identificar los metabolitos secundarios presentes en el látex de <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana”. Evaluar la genotoxicidad <i>in vitro</i> del látex de <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana”. 	El látex de <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana” presenta efecto genotóxico en un ensayo <i>in vitro</i> frente a ADN de <i>Staphylococcus aureus</i> .	<p>Aspectos Botánicos <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana”</p> <p>Pruebas de Genotoxicidad Se pueden definir como pruebas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>, diseñadas para detectar compuestos que induzcan daño genético, directa o indirectamente, por diversos mecanismos.</p>	<p>Variable Independiente: Concentración del látex de <i>Sonchus asper</i> (L). Hill “qasa isqana”</p> <p>Indicador: Concentración en porcentaje (%) del látex.</p> <p>Variables Dependientes: Efecto genotóxico frente a ADN de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> <p>Indicador: Grado de fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN) genómico de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Tipo de investigación : Básica – experimental.</p> <p>Diseño Experimental: El experimento se realizará bajo la guía del modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica.</p> <p>Población: <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill. “qasa isqana”, que crece en los diferentes pisos ecológicos de la provincia de Huamanga.</p> <p>Muestra: Muestreo aleatorio simple de <i>Sonchus asper</i> (L.) Hill. “qasa isqana”, para la obtención directa del látex, en la ciudad de Huamanga.</p> <p>Unidad experimental: ADN genómico de <i>Staphylococcus aureus</i> a concentración de 1500 ng/ μL por cada ensayo.</p> <p>Análisis estadístico paquete estadístico SPSS, Pruebas de Kruskal-Wallis.</p>