

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



**Evaluación de la Genotoxicidad *in vitro* del látex de
dos variedades de *Musa paradisiaca* L. “plátano”
frente a ADN humano y de *Leishmania spp.*
Ayacucho. 2017**

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

Presentado por la:

Bach. MENDOZA ALMEIDA TANIA

Ayacucho – Perú

2017

A Dios por iluminar mi camino
diariamente

A mis padres Orlando y Olga por darme
la vida y el amor.

A mis hermanos; Edwin y Merinia.

A Jonathan Yuri por el amor y ayuda
constante.

A Gabriel, mi más grande felicidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por acogernos para concluir nuestra formación profesional y nos da la oportunidad de servir en el desarrollo social y económico del país.

A la Facultad de Ciencias de la Salud, a la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por instruirme en sus aulas y laboratorios, así mismo a todos los docentes por su agradable compañía y enseñanza durante mi vida estudiantil

Al Blgo. Tomás Yuret Miranda Tomasevich, asesor del presente trabajo, por su estímulo constante, desinteresado apoyo y experiencia científica

A los responsables del Laboratorio de Biología Molecular, por su apoyo durante la ejecución del ensayo genotóxico.

A los responsables del Laboratorio de Farmacognosia, por su apoyo en la identificación fitoquímica de las muestras de látex de plátano.

ÍNDICE

	Página
Dedicatoria	iii
Agradecimiento	v
Resumen	xv
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	03
2.1 Antecedentes del estudio.	03
2.2 Marco conceptual	07
2.2.1 <i>Musa paradisiaca</i> “plátano”	07
2.2.1.2 Descripción botánica	07
2.2.1.3 Distribución geográfica	08
2.2.1.4 Diversidad genética	08
2.2.1.5 Composición química	08
2.2.1.6 Compuestos fenólicos y polifenólicos	08
2.2.1.7 Diversidad estructural	08
2.2.1.8 Actividad biológica	09
2.2.1.9 Látex	09
2.2.2 Leishmaniosis	10
2.2.2.1 Etiología	10
2.2.2.2 Ciclo Biológico.	11
2.2.2.3 Distribución geográfica	13
2.2.2.4 Tipos de <i>Leishmaniasis</i>	14
2.2.2.5 Tratamiento	14
2.2.3 ADN genómico	15
2.2.3.1 Ácidos nucleicos	15
2.2.3.2 Importancia de los ácidos nucleicos	17
2.2.4 Electroforesis en gel	17
2.2.5 Espectrofotometría	19
2.2.6 Toxicidad y genotoxicidad	19
2.2.6.1 Toxicidad	19
2.2.6.2 Genotoxicidad	19
2.2.6.3 Agente genotóxico	21
2.2.6.4 Mecanismo de Genotoxicidad	23
2.2.6.5 Evaluación de la genotoxicidad mediante ensayos <i>in vitro</i>	23

2.2.6.6 Ensayo cometa (EC)	24
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Lugar de ejecución	27
3.2 Población y muestra	27
3.2.1 Población	27
3.2.2 Muestra	27
3.2.3 Muestreo	27
3.3 Unidad experimental	27
3.4 Metodología y recolección de datos	28
3.4.1 Recolección de la muestra	28
3.4.2 Preparación del látex	28
3.4.3 Identificación fitoquímica del látex de <i>Musa paradisiaca</i> “plátano”	28
3.4.4 Extracción de ADN genómico a partir de linfocitos humano	28
3.4.4.1 Procedimiento	28
3.4.5 Ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> :	29
3.4.5.1 Fase de cuantificación de ADN genómico de linfocitos humano	30
3.4.5.2 Fase de tratamiento de ADN genómico en estudio	30
3.4.6 Fase de electroforesis	30
3.4.6.1 Procedimiento	30
3.4.7 Fase de lectura por radiación UV	31
3.4.8 Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad	31
3.5 Tipo de investigación	32
3.5.1 Diseño de investigación	32
3.6 Análisis de datos estadísticos	32
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	43
VI. CONCLUSIONES	49
VII. RECOMENDACIONES	51
VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	53
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

		página
Tabla 1	Clasificación taxonómica de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano”	07
Tabla 2	Descripción morfológica de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano”	07
Tabla 3	Distribución geográfica de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano”.	08
Tabla 4	Clasificación de los principales compuestos fenólicos.	09
Tabla 5	Especies y subespecies de Leishmania.	11
Tabla 6	Drogas para el tratamiento de leishmaniosis	15
Tabla 7	Detección mediante el tipo de ensayo cometa.	25
Tabla 8	Descripción general de los diferentes modelos utilizados en el ensayo del cometa, sus características y aplicaciones.	26
Tabla 9	Preparación de las soluciones de tratamiento del ADN en estudio, con las diferentes concentraciones del látex de <i>Musa paradisiaca</i> L “plátano” variedad “seda” o “isla”. Ayacucho 2017.	30
Tabla 10	Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.	31
Tabla 11	Diseño de investigación	32
Tabla 12	Identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios del látex de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” variedad “seda”. Ayacucho 2017.	33
Tabla 13	Identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios del látex de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” variedad “isla”. Ayacucho 2017.	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .	12
Figura 2	Distribución geográfica de las especies de <i>Leishmanias</i> en el Perú.	13
Figura 3	Estructura química Ácido nucleico.	16
Figura 4	Estructura química de un Nucleótido (base + azúcar + fosfato).	16
Figura 5	Partes básicas de una cámara de electroforesis en agarosa o poliacetato de celulosa.	18
Figura 6	Organización de la información hereditaria en los seres humanos.	20
Figura 7	Apareamiento optimizado de las bases nitrogenadas A=T y G=C vía puentes e hidrógeno.	21
Figura 8	Efecto del daño inducido al DNA por agentes químicos, físicos y biológicos.	22
Figura 9	Diversos tipos de daño al complejo DNA-proteína considerados como los mecanismos de acción de la Genotoxicidad.	23
Figura 10	Esquema de los principios generales de la formación de la cola del cometa bajo condiciones alcalinas.	25
Figura 11	Efecto genotóxico del látex de <i>Musa paradisiaca L.</i> “plátano” variedad “seda” a diferentes concentraciones, frente a ADN genómico humano en 1 hora de incubación a 37°C.	34
Figura 12	Efecto genotóxico del látex de <i>Musa paradisiaca L.</i> “plátano” variedad “isla” a diferentes concentraciones, frente a ADN genómico humano en 1 hora de incubación a 37°C.	35
Figura 13	Efecto genotóxico del látex de <i>Musa paradisiaca L.</i> “plátano” variedad “seda” a diferentes concentraciones, frente a ADN genómico de <i>Leishmania spp.</i> en 1 hora de incubación a 37°C.	36
Figura 14	Efecto genotóxico del látex de <i>Musa paradisiaca L.</i>	37

“plátano” variedad “isla” a diferentes concentraciones, frente a ADN genómico de *Leishmania spp.* en 1 hora de incubación a 37°C.

- Figura 15 Prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.037$) para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “seda” a diferentes concentración, frente al ADN genómico humano en 1 hora de incubación a 37°C 38
- Figura 16 Prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.037$) para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “seda” a diferentes concentración, frente al ADN genómico de *Leishmania spp.* en 1 hora de incubación a 37°C. 39
- Figura 17 Prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.009$) para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla” a diferentes concentración, frente al ADN genómico humano en 1 hora de incubación a 37°C. 40
- Figura 18 Prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.007$) para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla” a diferentes concentración, frente al ADN genómico de *Leishmania spp.* en 1 hora de incubación a 37°C. 41

ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Certificación de clasificación taxonómica de <i>Musa paradisiaca</i> L. "Plátano". Variedad seda. Ayacucho 2017.	60
Anexo2	Certificación de clasificación taxonómica de <i>Musa paradisiaca</i> L. "Plátano". Variedad isla. Ayacucho 2017.	61
Anexo 3	Esquema del ensayo de genotoxicidad <i>In vitro</i> del látex de dos variedades de <i>Musa paradisiaca</i> L. "Plátano" frente a ADN humano y de <i>Leishmania spp.</i> Ayacucho 2017.	62
Anexo 4	Campana de frutos de ambas variedades de plátano. Ayacucho 2017	63
Anexo 5	Obtención del látex de <i>Musa paradisiaca</i> L. "Plátano". Ayacucho 2017.	64
Anexo 6	Identificación fitoquímica del Látex de <i>Musa paradisiaca</i> L. "plátano" variedad seda e isla. Ayacucho 2017.	65
Anexo 7	Extracción de ADN Genómico de linfocitos humanos Ayacucho 2017.	66
Anexo 8	Fase de electroforesis para la detección de Genotoxicidad Ayacucho 2017.	67
Anexo 9	Fase de radiación UV para la visualización en gel de agarosa. Ayacucho. 2017.	68
Anexo 10	Fase de lectura por radiación UV. Ayacucho 2017	69
Anexo 11	Valores numéricos del grado de genotoxicidad de <i>Musa paradisiaca</i> L. "plátano" variedad "seda", según la concentración del látex, frente a ADN genómicos humano y de <i>Leishmania spp.</i> incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2017.	70
Anexo 12	Valores numéricos del grado de genotoxicidad de <i>Musa</i>	71

	<i>paradisiaca</i> L. “plátano” variedad “isla”, según la concentración del látex, frente a ADN genómicos humano y de <i>Leishmania spp.</i> incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2017.	
Anexo 13	Resultados de la Prueba Kruskal Wallis del efecto genotóxico del látex de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” variedad seda e isla frente al ADN genómico de humano y <i>leishmania</i> respectivamente a 1 hora de incubacion a 37°C variedad isla. Ayacucho. 2017.	72
Anexo 14	Evaluación de la diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del látex de <i>Musa paradisiaca</i> L.” plátano” variedad seda frente al ADN genómico Humano mediante la prueba de Von Ferroni. Ayacucho 2017.	73
Anexo 15	Evaluación de la diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del látex de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” variedad seda frente al ADN genómico <i>Leishmania spp.</i> mediante la prueba de Von Ferroni. Ayacucho 2017.	74
Anexo 16	Evaluación de la diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del látex de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” variedad isla frente al ADN genómico Humano mediante la prueba de Von Ferroni. Ayacucho 2017.	75
Anexo 17	Evaluación de la diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del látex de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” variedad isla frente al ADN genómico <i>Leishmania spp.</i> mediante la prueba de Von Ferroni. Ayacucho 2017	76
Anexo 18	Matriz de consistencia	77

RESUMEN

El látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” en la medicina tradicional es empleada como agente antibacteriano, anti verrugoso y antiparasitario. El objetivo fue evaluar de la genotoxicidad *in vitro* del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedades “seda” e “isla” frente a ADN genómico humano y de *Leishmania spp.* El látex fue obtenido directamente del fruto no maduro. La marcha fitoquímica revela la presencia de flavonoides taninos y fenoles. La evaluación de la genotoxicidad *in vitro* fue determinado mediante el “método Tomasevich”(látex 5,10,50 y 100%). Los resultados de la variedad “**seda**”, revela la misma actividad frente al ADN genómico humano y *Leishmania spp.*: con 5% de látex han fragmentado entre 5% a 20% del ADN; mientras que las concentraciones de 10%, 50% y 100 % de látex, han fragmentado totalmente al ADN. Por otro lado la variedad “**isla**”, frente al ADN genómico humano y *Leishmania spp.* ha mostrado resultados similares: con 5% de látex han fragmentado entre 5% a 20% del ADN, con 10% de látex entre 20% a 40%, mientras que las concentraciones de 50% y 100 %, han fragmentado totalmente al ADN. La prueba de Kruskal-Wallis, determinó que la concentración del látex de cada una de las dos variedades, influye en el grado de fragmentación del ADN: variedad “seda” frente al ADN humano y de *Leishmania spp.* en ambos casos ($p=0,037$); variedad “isla” frente al ADN humano ($p=0,009$) y *Leishmania spp.* ($p=0,007$). Se concluye que el látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedades “seda” e “isla” presentan importante actividad genotóxica frente a ADN humano y de *Leishmania spp.*

Palabras clave: *Musa paradisiaca* L., actividad genotóxica, ensayo Cometa

I. INTRODUCCIÓN

El Perú presenta una riqueza y mega diversidad de plantas medicinales nativas que constituyen la medicina tradicional, ya que fueron utilizadas por sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud. 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 población¹. La leishmaniasis constituye un espectro de enfermedades causadas por especies del protozoo flagelado *Leishmania*, intracelular obligado del humano y otros mamíferos, que produce lesiones a niveles cutáneo, mucocutáneo y visceral. Es transmitida a los humanos por la picadura de flebotomos hembra infectados. En América, el vector es el mosquito *Lutzomyia*, y en Europa, el género *Phlebotomus*².

Si bien es cierto *Musa paradisiaca* L. "plátano" es una planta introducida en nuestro país, en medicina tradicional su látex presenta actividad antibacteriana, anti verrugosa y antiparasitaria (leishmaniosis). Todo esto nos podría hacer pensar que este látex podría estar ejerciendo también el 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 seco y fresco de *Musa paradisiaca* L. "plátano" de tres variedades sobre *Leishmania* peruviana y las células del organismo, así como su posterior sugerencia al empleo en medicina tradicional.

El ensayo cometa detecta el daño simple y de doble cadena al ADN es la electroforesis de una sola célula, donde se evalúan los niveles de daño y

reparación al ADN en poblaciones celulares sin trabajar con células en proliferación. Es un sistema que evidencia daño genotóxico inducido³.

El fundamento que evidencia las células de interés, embebidas en un gel de agarosa, por medio de detergentes y altas concentraciones de sal. Después el ADN liberado es sometido a la acción de un campo eléctrico a pH neutro⁴. En células que exista incremento del daño en el ADN se formarán pequeños fragmentos, estos al ser sometidos a una corriente eléctrica tendrán la propiedad de penetrar en los poros 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. Mediante 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 ADN⁵. La importancia de este ensayo cometa se ha incrementado en los últimos años, ya que ha demostrado ser un método muy sensible en la detección del daño al ADN a nivel celular⁶.

El presente estudio, la estimación del daño genotóxico *in vitro* fue determinado con el “método Tomasevich”, que consiste en exponer al ADN genómico humano y al ADN genómico de *Leishmania* a diferentes concentraciones del látex de plátano variedad seda e isla 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 medicinales⁷.

Se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivos generales

Determinar la genotoxicidad *in vitro* del látex de dos variedades de *Musa paradisiaca L.* “plátano” frente a ADN humano y de *Leishmania spp.*

Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el del látex de *Musa paradisiaca L.* “plátano” de las dos variedades (seda e isla).
- Evaluar la genotoxicidad *in vitro* del látex de *Musa paradisiaca L.* “plátano” de las dos variedades (seda e isla) a través de la fragmentación del ADN genómico humano y de *Leishmania spp.*

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio.

Nuestro país posee una flora rica en plantas medicinales, estos fitofármacos experimentan cada día un incremento de la preferencia en el consumo nacional, como también en otros países.

En los últimos años las plantas medicinales han adquirido gran importancia en terapias alternativas o complementarias, por esta razón los estudios genotóxicos de los fitofármacos son esenciales para que puedan ser registrados y reconocidos como productos farmacéuticos y puedan ser consumidos por el hombre. Muchos de los compuestos presentes en las plantas pueden presentar propiedades mutagénicas relacionadas con procesos de diferenciación celular, teratógenos y alteraciones genéticas en la descendencia, por ello es de suma importancia realizar el estudio de genotoxicidad.

El ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina es actualmente muy usado para evaluar el efecto genotóxico que es un método muy sensible para detectar niveles de daño por fragmentación de la cadena de ADN³.

El 2007 se evaluó el potencial mutagénico del extracto de la corteza de *Musa paradisiaca* en células sanguíneas en ratones albinos *in vivo*. Para esta evaluación, se utilizó el ensayo cometa y se utilizaron extractos de las siguientes concentraciones (1000, 1500 y 2000 mg / kg de peso corporal). El resultado en células de sangre periférica en el ensayo cometa mostró que el extracto de la corteza de *Musa paradisiaca* inducía estadísticamente aumento significativo en la cantidad de daño en el ADN de leucocitos en los dos mayores concentraciones del extracto, y mediante el ensayo de micronúcleo, también produce aumento significativo en los eritrocitos policromáticos. Se concluye que el extracto de cáscaras de *Musa paradisiaca* mostró efecto mutagénico en células de sangre periférica de ratones albinos suizos⁸.

El látex del tallo de *Jatropha gossypifolia* se utiliza de forma rutinaria por algunos habitantes de las ciudades en el sur de Nigeria para detener el sangrado de la nariz, las encías y la piel lesionada. La seguridad de su uso se investigó en los diferentes grupos de ratas albinas utilizando diferentes dosis del látex. Diferentes números de incisiones se hicieron en los muslos de los diferentes grupos de animales y diferente dosis del látex.

El procedimiento se repitió diariamente durante 18 días. El grupo de control no se realizó una incisión. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en el resultado de los parámetros bioquímicos y hematológicos. Los resultados de este estudio mostraron que este látex no tiene efectos nocivos⁹.

La composición química así como sus propiedades biológicas de las plantas medicinales dependen de múltiples factores entre los cuales podemos destacar: condiciones del clima, propiedades edáficas de la región, la fase vegetativa al momento de la recolección y otras¹.

Hussain M. *et al.* el año 2010 evaluó la eficacia ovicida de las hojas de *Musa paradisiaca*, usados para el control de gusanos en el ganado ovino. Para este propósito, se llevó a cabo la prueba *in vitro* de eclosión de los huevos de nemátodos con extracto acuoso e hidroalcohólico de las hojas de la planta. La Concentración letal 50 (CL50) valores de eclosión de huevo fueron 0,0207 y 0,4813, respectivamente. Este estudio muestra que las hojas de *Musa paradisiaca* presentan actividad antihelmíntica *in vitro*. El estudio también sugiere estudios farmacológicos y toxicológicos más profundos para su uso más seguro en medicina veterinaria¹⁰.

En 2011 Hashemi S. *et al.* Demuestran que el látex de higuera podría inhibir la proliferación de línea celular de cáncer sin ningún efecto citotóxico sobre las células normales humanas. Se observó que 5 mg/ml era la concentración óptima en la inhibición del crecimiento línea celular¹¹.

Este estudio es una investigación preclínica en el uso de plátano (*Musa paradisiaca L.*), cuyo objetivo principal fue evaluar el potencial antimicrobiano, antiinflamatorio y la viabilidad de las células en los extractos de las hojas y pseudotallo de plátano *Musa paradisiaca L.* Los extractos fueron enumerados de acuerdo con la parte de la planta utilizada. *Musa 1* (extracto etanólico de la hoja), *Musa 2* (extracto acuoso de hoja), *Musa 3* (extracto etanólico del pseudotallo) y *Musa 4* (extracto acuoso del pseudotallo). Los

ensayos *in vitro* se llevaron a cabo mediante Método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-iltetrazolio) y para antimicrobiano se usó discos de difusión en agar y perforación. Para los ensayos *in vivo*, 36 ratas Wistar fueron utilizados en el experimento de curación y 36 ratones en el edema de la oreja inducido por capsaicina, proporcionada por el vivero central de la creación de la Universidad Federal de Alagoas, y manipularon de acuerdo con normas establecidas por el comité de ética para utilización de animales de laboratorio.

Se encontró actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y hongos. La prueba de viabilidad celular se llevó a cabo a concentraciones de 100, 200, 1000 y 2000 ug/mL y mostró que los extractos a una concentración de 200 ug/mL no indujeron toxicidad en el linaje de macrófagos¹².

Los extractos también se probaron en experimentos *in vivo* para evaluar el potencial de curación y antiedematogénico de hojas y pseudotallo de plátano. Se encontró que existe una inhibición significativa en la formación de edema inducida por la capsaicina, lo que indica que el extracto no tiene lugar acción antiinflamatoria. En cuanto a la cicatrización de heridas resultó mejor que el control positivo¹³.

Jatropha gossypifolia L. (*Euphorbiaceae*), popularmente conocido como el algodón es un arbusto lechoso que destaca por sus propiedades medicinales. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos del látex de *J. gossypifolia*, usando *Allium cepa* L. como sistema de prueba. Las semillas de *A. cepa* se expusieron a cinco concentraciones de látex (1,25; 2,5; 5; 10 y 20 mL / L) con el fin de evaluar los parámetros de toxicidad (evaluación de crecimiento de la raíz), citotoxicidad (frecuencia índice mitótico) y genotoxicidad (frecuencia de alteraciones cromosómicas)¹⁴.

El látex mostró una disminución significativa en valor eficaz crecimiento, así como el índice mitótico de las concentraciones ensayadas, y frecuencia significativa de puentes cromosómicos también indica potencial mutagénico para los cromosomas de *Allium cepa*. Teniendo en cuenta que el látex se utiliza en las terapias populares, y que el sistema de prueba *A. cepa* presenta una buena correlación con las pruebas realizadas en los mamíferos, se puede señalar que su uso para fines medicinales puede ser perjudicial para la salud humana, especialmente si se ingiere¹⁴.

El látex obtenido a partir de *Hancornia speciosa* se utiliza ampliamente en la medicina tradicional para tratar una variedad de enfermedades, incluyendo la diarrea, úlcera, gastritis, tuberculosis, acné y verrugas. En este estudio, se examinaron los efectos de citotoxicidad y genotoxicidad de látex de *H. speciosa* sobre las células meristemáticas de raíz de *Allium cepa*, en donde los bulbos de la cebolla fueron expuestas a diferentes concentraciones de látex para posteriormente ser sometidos a un análisis microscópico usando tinción de Giemsa. Se usó agua como control negativo y azida de sodio como un control positivo.

Los resultados mostraron que, en las condiciones de prueba, el índice mitótico (MI) de las raíces de cebolla sometidos a tratamiento de látex no difirió significativamente del control negativo, lo que sugiere que el látex no es citotóxica. También se observó una baja incidencia de aberraciones cromosómicas en las células tratadas con látex *H. speciosa*, lo que indica que el látex no tiene efecto genotóxico tampoco. Los resultados indican que en concentraciones ensayadas el látex de *H. speciosa* probablemente no es nocivo para la salud humana y se puede usar potencialmente en la medicina¹⁵.

Los productos naturales han sido utilizados en la medicina popular debido a la convicción de que estos efectos adversos presentarían insignificante.

Por lo tanto, saber acerca de los posibles beneficios y/o perjuicios de estos productos utilizados por las poblaciones humanas, tiene gran importancia para la salud pública. Los estudios para identificar las sustancias potencialmente mutagénicas son muy necesarios hoy en día, ya que el hombre se expone a un número cada vez mayor de agentes químicos y físicos y aún más de origen vegetal, que pueden suponer un riesgo para su salud.

Los metabolitos secundarios de las plantas medicinales pueden dañar el material genético, de la persona que la consume, lo que resulta en mutaciones incluso alteraciones correlacionadas, tales como la oncogénesis. Por tanto el siguiente proyecto tiene el propósito de demostrar el efecto genotóxico del látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" frente al ADN humano y de *Leishmania spp.* Debido a que esta planta se usa tradicionalmente para el tratamiento de leishmaniosis cutánea.

2.2 Marco conceptual

2.2.1 *Musa paradisiaca* L. “plátano”

2.2.1.1 Clasificación Taxonómica

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Musa paradisiaca* L. “plátano”^{16,17}.

Taxonomía	
División:	Magnoliophyta
Clase:	Liliopsidae
Orden:	Escitaminales (Zingiberales)
Familia:	Musaceae
Género:	<i>Musa</i>
Especie:	<i>Musa paradisiaca</i> L.

2.2.1.2 Descripción botánica

Tabla 2. Descripción morfológica de *Musa paradisiaca* L. “plátano”¹⁷.

Droga	Descripción
Raíz	Presenta raíces secundarias en forma de cabellera. El elemento perenne es el rizoma del cual brotan vástagos o chupones que reemplazan al tallo principal después de florecer y morir éste.
Tallo	Rizoma grande y almidonoso, coronado con yemas, los cuales desarrollan cuando la planta ha florecido y fructificado, da origen a las raíces y los peciolos, cuyas vainas formarán el pseudotallo.
Hojas	Más grandes del reino vegetal, de color verde o amarillo verdoso claro, presenta márgenes lisos y de nervadura pinnadas. Pecíolo elíptico y alargado de 60 hasta 100 cm. Cada planta presenta entre 5 y 15 hojas funcionales (pueden llegar a tener 34 a 36 en todo el ciclo).
Flores	Inflorescencia que emerge del centro de los pseudotallos en posición vertical; presenta un escapo pubescente de 5-6 cm de diámetro, el cual termina en un racimo colgante de 1 a 2 m de largo. Flores con 6 estambres, uno estéril, gineceo con 3 pistilos con ovario ínfero.
Frutos	Oblongo, es una baya alargada, encorvada y de corteza lisa, de color amarillo – verdoso, amarillo, amarillo-rojizo o rojo. Pulpa blanca a amarilla, rica en almidón y dulce, en los plátanos, algo astringente por su contenido en látex.

2.2.1.3 Distribución geográfica

Tabla 3. Distribución geográfica de *Musa paradisiaca* L. “plátano”.

Distribución	
Perú	Región Junín (Satipo), Huánuco (Leoncio Prado), Ucayali (Padre Abad, Coronel Portillo), Huallaga (Tocache), San Martín (Lamas) y Piura (Sullana) ¹⁷ .
Mundial	Uganda, Ghana, Ruanda, Nigeria y Costa de Marfil. Sri Lanka, Colombia y Ecuador, Perú y Venezuela. Indonesia, Polinesia, Hawái, Filipinas, India, Brasil, Ecuador, Colombia, Venezuela, Panamá, Honduras, Costa Rica, entre otros países con regiones tropicales ¹⁷ .

2.2.1.4 Diversidad genética

Existen tres especies distintas de plátano o banana: la variedad dulce, en Centro y Sur América llamamos el banano (*Musa sapienta* o *sapientumy Musa nana*), el plátano (*Musa paradisiaca*), y las variedades no comestibles y ornamentales (*Musa textiles* y *Musa ensete*)¹⁸.

2.2.1.5 Composición química

Se ha reportado que el látex de *Musa paradisiaca* “plátano” presenta ácidos fuertes, bases cuaternarias, antocianinas, fenoles, flavones, resinas, piperazinas, taninos tirogálicos, triterpenos, entre otros¹⁸.

2.2.1.6 Compuestos fenólicos y polifenólicos

Un gran grupo de compuestos fenólicos y polifenólicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal por ende constituyen ya de por si una gran fuente de antioxidantes naturales¹⁹.

Estos compuestos fenólicos poseen entre uno o más núcleos de ácidos aromáticos, en el cual la presencia, por ejemplo, de grupos hidroxilos en su composición son los responsable de dicho efecto, color y textura de las plantas²⁰.

Generalmente suelen ser soluble en agua y es común encontrarlos formando glicósidos e inclusive han sido localizarlos en vacuolas celulares²¹. Su acidez, ya sea en mayor o menor grado está supeditada en la unión entre el oxígeno e hidrógeno del grupo hidroxilo. Esta tendencia a ser generalmente soluble en agua tiene en cuenta también a nivel global al anión fenóxido²².

2.2.1.7 Diversidad estructural

La estructura química de los compuestos fenólicos varía desde moléculas simples, estructuras que tienen en su composición ácido benzoico, hasta compuestos poliméricos de alto meso molecular como las ligninas y los taninos condensados. En la siguiente tabla se muestra una clasificación de los

principales compuestos fenólicos teniendo en cuenta el esqueleto carbonado la cual es el responsable de la diferenciación estructural entre estos grupos.

Tabla 4. Clasificación de los principales compuestos fenólicos²³.

Tipo	Estructura Base
Fenoles simples	C6
Ácidos benzoicos	C6-C1
Ácido hidroxinámicos	C6-C3
Cumarinas	C6-C3
Lignines	(C6-C3) _n
Estilbenos / flavonoides*	C6-C3-C6
Taninos condensados	(C6-C3-C6) _n

*Incluyen para estos en su conformación estructural anillos aromáticos A y B.

2.2.1.8 Actividad biológica

Muchos de los compuestos polifenólicos presentan una actividad antiradicalaria por ende el efecto antioxidante no solo como secuestradores de radicales libres sino inclusive como quelantes de metales. Esta propiedad está determinada por el efecto de deslocalización de electrones que es posible gracias a la presencia de núcleos aromáticos y grupos hidroxilos²⁴.

Presenta también actividad antimicrobiana y antimutagénica, hipocolesterolémica e hipolipidémica, antitúsígena y antiasmática²⁵. Se le atribuye también efectos beneficiosos en la agregación plaquetaria así como actividad antiinflamatoria. Se reportan a la fecha también efectos anticarcinogénicos como moduladores en el proceso de inhibición del estado cancerígeno.

2.2.1.9 Látex

El látex natural es una suspensión acuosa coloidal compuesta de algunas grasas, ceras y diversas resinas gomosas, frecuentemente es blanco y lechoso, aunque también puede presentar tonos anaranjados, rojizos o amarillentos²⁶. El látex de ciertas plantas resulta tóxico y venenoso, como el del cardón (*Euphorbia canariensis*) que se utiliza para cazar peces²⁷.

En el látex de *Musa paradisiaca L.* (plátano) se encontraron esteroides, flavonoides y taninos²⁸. Otro componente activo encontrado en la cáscara de bananas verdes fueron extraídos e identificados como flavonoide Leucocianidina²⁹. A demás están los taninos, eugenol, tiramina, compuestos fenólicos, antocianinas, sales minerales y vitaminas A, C, B1, B2, B5; serotonina, levartiretol, dopamina (fruto maduro y cascara), alcaloides, fierro, y cita dos esteroides beta-sitosterol y estigmasterol³⁰.

2.2.2 Leishmaniosis

El término leishmaniosis hace referencia al conjunto de manifestaciones clínicas producidas por diversas especies del género *Leishmania*. Al menos existen 20 especies patógenas de *Leishmania* que transmitidas por medio de la picadura de un mosquito flebótomo causan distintas manifestaciones clínicas en el hombre³¹.

2.2.2.1 Etiología

El agente etiológico es un protozooario dimórfico que pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, del genero *Leishmania* (orden kinetoplastida). Morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad y distribución geográfica. Existen en todo el mundo cerca de 30 especies que infectan a los animales, de las cuales 21 pueden infectar al hombre En el nuevo mundo, existen reconocidas un total de 20 especies del genero *Leishmania*, llamadas *Leishmanias* neotropicales, de las cuales 14 son conocidas que infectan al hombre³¹.

El mosquito se infecta al ingerir sangre con formas amastigote del parásito, contenidas en sangre de mamíferos. Durante 4-25 días, el parásito sigue su desarrollo y se transforma en promastigote, comenzando a dividirse por fisión binaria, aumentando su número y migrando hacia la faringe y boca, para ser inyectadas en la siguiente picadura³².

Después de ésta, las formas promastigote entran en contacto con la circulación sanguínea del vertebrado y son fagocitadas por células del sistema retículo endotelial, para transformarse en amastigotes y comenzar a multiplicarse también por fisión binaria, hasta que rompen la célula y quedan libres en la circulación siendo fagocitadas de nuevo y repitiéndose el ciclo en el hospedador vertebrado hasta que son ingeridas por un nuevo mosquito³².

Tabla 5. Especies y subespecies de *Leishmania*³².

Especie	Localidad
SUBGÉNERO LEISHMANIA	
Complejo <i>L. Donovanii</i>	
<i>L. donovani</i> (Laveran y Mesnil, 1903)	India, China, Bangladesh
<i>L. archibaldi</i> (Castellani y Chalmers, 1919)	Sudán, Etiopía
Complejo <i>L. Infantum</i>	
<i>L. infantum</i> (Nicolle, 1908)	Centronorte de Asia, noroeste de China, Oriente Medio, noroeste de África
<i>L. chagasi</i> (Cunha y Chagas, 1937)	América central y del sur
Complejo <i>L. Tropica</i>	
<i>L. tropica</i> (Wright, 1903)	Áreas urbanas de Próximo Oriente e India
<i>L. killicki</i> (Rioux, Lanotte y Prating, 1986)	Túnez
<i>L. major</i>	África, Oriente Medio, norte de Asia
<i>L. arabica</i> (Peters, Elbihari, Evans, 1986)	Arabia Saudí
<i>L. aethiopica</i> (Bray, Ashford, Bray, 1973)	Etiopía, Kenya
<i>L. gerbilli</i> (Wang, Qu, Guan, 1973)	China, Mongolia
Complejo <i>L. Mexicana</i>	
<i>L. mexicana</i> (Biagi, 1953)	México, Belice, Guatemala, sur de Estados Unidos,
<i>L. amazonensis</i> (Lainson and Shaw, 1972)	Bajo Amazonas y Brasil
<i>L. venezuelensis</i> (Bonfante-Garrido, 1980)	Venezuela
SUBGÉNERO VIANNIA (LAINSON AND SHAW, 1977)	
Complejo <i>Leishmania braziliensis</i>	
<i>L. braziliensis</i> (Viannia, 1911)	Brasil
<i>L. peruviana</i> (Vélez, 1913)	Oeste de los Andes
Complejo <i>L. Guyanensis</i>	
<i>L. guyanensis</i> (Floch, 1954)	Guayana Francesa, Guyana y Surinam
<i>L. panamensis</i> (Lainson and Shaw, 1972)	Panamá, Costa Rica

2.2.2.2 Ciclo Biológico.

Todas las leishmanias poseen un ciclo de vida similar, es importante el conocimiento de cada uno de ellos para poder entender y aplicar ciertas medidas de control. En general se pueden producir diferentes ciclos, uno principalmente silvestre donde la *Leishmania* circula entre los reservorios naturales, manteniendo el ciclo con la participación de vectores propios de la zona. En un segundo ciclo, estos vectores infectados pueden atacar al hombre y a los animales domésticos o peridomésticos caso de los perros o equinos, su rol como reservorios aún es discutido, sin embargo se cuentan con estudios donde se han logrado infectar flebotomíneos a partir de las lesiones de la piel de perros³³.

De otro lado se puede producir un tercer ciclo donde el propio enfermo con leishmaniasis se constituye en reservorio, hallazgos que apoyan esta hipótesis es el aislamiento de leishmanias a partir de triturados de una suspensión de flebotomíneos (*Lu. intermedia*) alimentados en los bordes de úlceras de pacientes con leishmaniasis³⁴.

o la utilización de *Lutzomyias* para xenodiagnóstico; asimismo se ha encontrado la presencia de casos de leishmaniasis y positividad a la leishmanina en integrantes de la familia de niños menores de 5 años con leishmaniasis que no habían ingresado a áreas de riesgo³⁵.

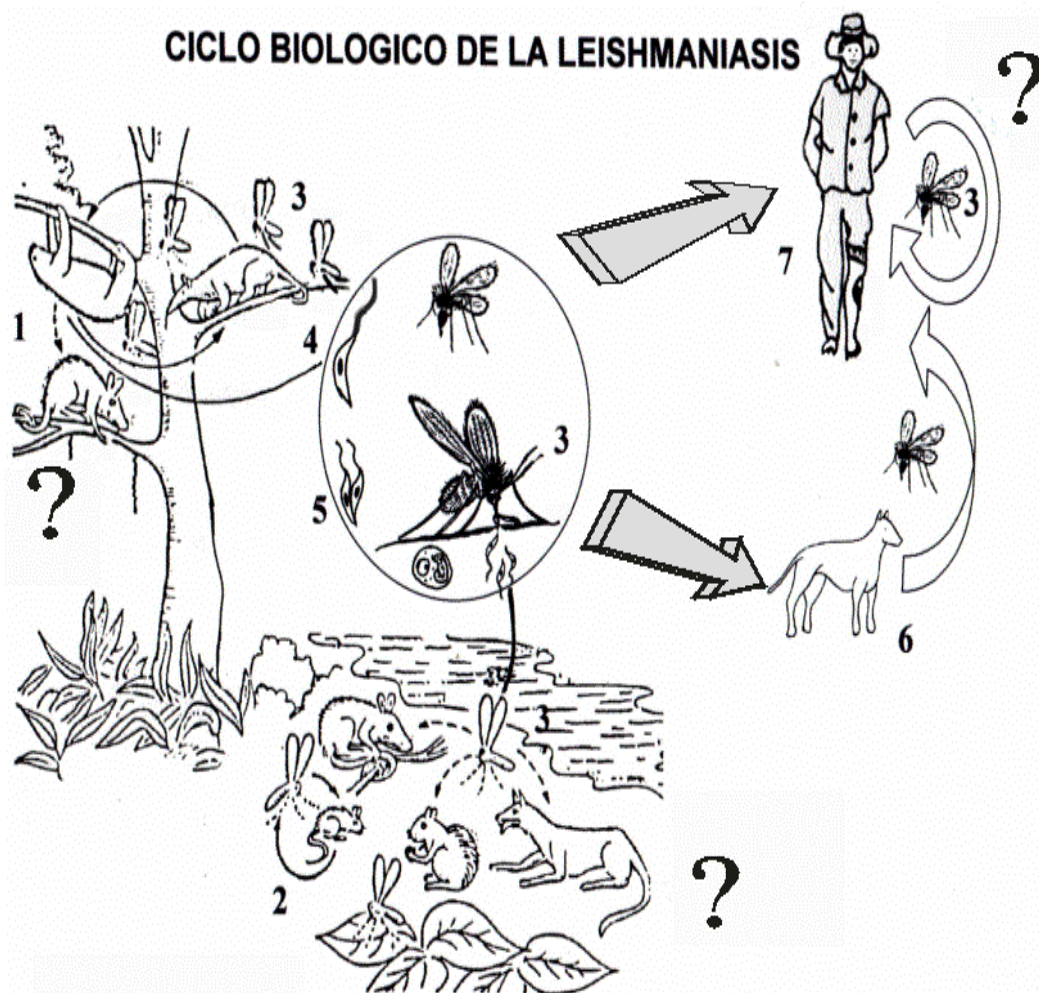


Figura 1. Ciclo biológico de Leishmaniasis. 1. Cuando una hembra de flebótomo ingurgita sangre de un animal parasitado, ingiere macrófagos con amastigotes. Estos se liberan para multiplicarse en el tubo digestivo, adquiriendo las formas de promastigotes infectivos. 2. Ante una nueva ingesta, el flebótomo inocula saliva para vasodilatar y con ella, pasan los promastigotes al animal y penetran en los macrófagos cerrándose el ciclo 3.Hembra hematófaga; 4. Forma promastigote de la *Leishmania*; 5.División del parásito; 6.Infección del perro; 7. Infección del hombre. Los signos de interrogación señalan la falta de conocimientos de los reservorios en nuestro medio y la hipótesis que el hombre sea un probable reservorio³⁶.

2.2.2.3 Distribución geográfica

En nuestro país, se tienen cinco especies reportadas hasta la actualidad. En la región amazónica, tres especies han sido reconocidas como agentes de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea conocida como leishmaniasis selvática o espundia: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) braziliensis*, siendo

esta última la de mayor importancia en la zona. En 1994 se reportó la presencia de *L. (V.) lainsoni* en seis pacientes procedentes de: Ayacucho (Canaire), Pasco (Sogorno-Oxapampa), de San Martín (Tocache) 13 y de Huánuco (Tingo María), encontrándose todas estas áreas al este de los Andes entre 600 a 2000 msnm. La leishmaniasis cutánea andina (Uta) es causada por la *L. (V.) peruviana* siendo endémica en el Perú, en áreas entre 800 a 3000 msnm se ha reportado su presencia hasta los 600 msnm. La incidencia también varía con la latitud, presentándose hasta los 13° de latitud al sur. Esta sub especie no es transmitida en la zona amazónica³⁷.

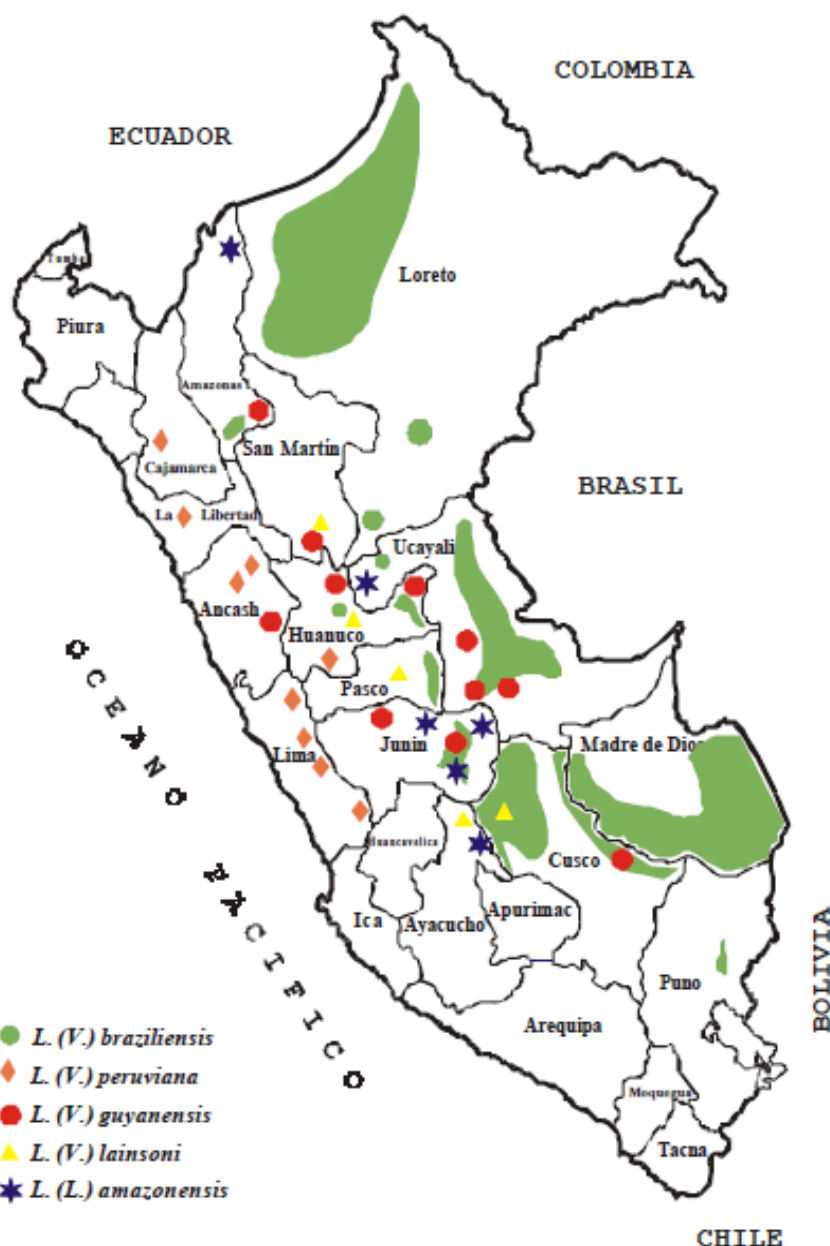


Figura 2. Distribución geográfica de las especies de *Leishmanias* en el Perú³⁷.

2.2.2.4 Tipos de *Leishmaniasis*

- **La leishmaniasis cutánea**

La leishmaniasis cutánea localizada a menudo se resuelve espontáneamente en 3-6 meses sin tratamiento, aunque algunas infecciones persisten indefinidamente. La mayoría de las personas responden muy bien a la terapia: urgente de una solución completa de la lesión, con una disminución del potencial de infecciones bacterianas secundarias y disminución de la cicatrización, es la regla. Esto no quiere decir que la enfermedad es, sin morbilidad, especialmente en las zonas donde incluso una mínima desfiguración facial puede condenar a las jóvenes a la vida sin la perspectiva de matrimonio o aceptación en la sociedad³⁸.

- **La leishmaniasis mucocutánea**

La leishmaniasis mucocutánea es crónica y progresiva. Esta forma de la enfermedad afecta a las membranas mucosas de la boca, la nariz y el paladar blando, y es especialmente debilitante y destructiva, que han causado la mutilación del tercio medio facial. La muerte puede ocurrir por infección secundaria y después de la invasión del tracto respiratorio de la mucosa, compromiso respiratorio y disfagia pueden conducir a la desnutrición y neumonía³⁸.

- **La leishmaniasis visceral**

La leishmaniasis visceral es una enfermedad sistémica grave, progresiva y potencialmente letal. Se tiende a afectar a las personas en los países pobres de la salud, con un estado nutricional deficiente, e incluso con el más leve depresión del estado inmunológico mucho más severamente que los individuos con buena salud, buen estado nutricional, y el sistema inmune intacto. En los individuos bien nutridos con el sistema inmune intacto, se espera una recuperación completa de la enfermedad visceral después del tratamiento con la medicación adecuada³⁸.

2.2.2.5 Tratamiento

Los fármacos utilizados son:

- a) Compuestos de antimonio pentavalente: estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina son los fármacos de elección para formas del Mediterráneo, India, China y Brasil; en cambio, la forma de África oriental.
- b) Diamidinas: pentamidina e hidroxistilbamidina; son alternativas en caso de que fallen las anteriores.

c) Otros: anfotericina B, rifampicina, cotrimoxazol, y metronidazol; son fármacos alternativos.

Tabla 6. Drogas para el tratamiento de leishmaniosis³⁹.

INFECTING ORGANISM	TREATMENT OF CHOICE	ALTERNATIVE TREATMENTS
Leishmaniasis: <i>Leishmania donovani</i> , <i>L. major</i> , <i>L. infantum</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. (Viannia) spp.</i>		
Cutaneous leishmaniasis	Sodium stibogluconate or meglumine antimoniate, 20 mg/Kg/day IV or IMx 20 days, or liposomal amphotericin B, 3mg/Kg/day IVx 7-10 doses	Miltefosine, 2.5 mg/Kg/day (max. 150 mg) PO X 28 days.
Mucosal leishmaniasis	Liposomal amphotericin B at 20-35 mg/Kg (total dose) given as 3 mg/Kg IV once daily	Sodium stibogluconate or meglumine antimoniate 20 mg/Kg/day IV or IM x 28 days; miltefosine 2.5mg/Kg/day (max 150 mg) PO x 28 days; amphotericin B deoxycholate, 1 mg/Kg IV qod or daily to a total dose of 20-40 mg/Kg
Visceral leishmaniasis	Liposomal amphotericin B, 8.3 mg/Kg/day IV x days 1-5, then at day 14 and 24	Sodium stibogluconate or meglumine antimoniate 20 mg/Kg/day IV or IM x 28 days; miltefosine 2.5 mg/dia (max. 150 mg/day) PO x 28 days; amphotericin B deoxycholate 0.5-1.0 mg/Kg/day or good to a total dose of 15-20 mg/Kg

2.2.3 ADN genómico

El ADN genómico es el DNA cromosómico nuclear, que ha sido aislado directamente de células o tejidos⁴⁰.

2.2.3.1 Ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos se forman cuando los nucleótidos se unen entre sí por medio de puentes fosfodiéster entre el átomo de C3' de un nucleótido y el C5' del siguiente. La secuencia lineal de los nucleótidos por lo general se expresa en dirección 5' a 3' con la abreviatura de las bases nitrogenadas respectivas. Por ejemplo ATCG representaría la secuencia adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G) en la dirección 5' a 3'⁴⁰.

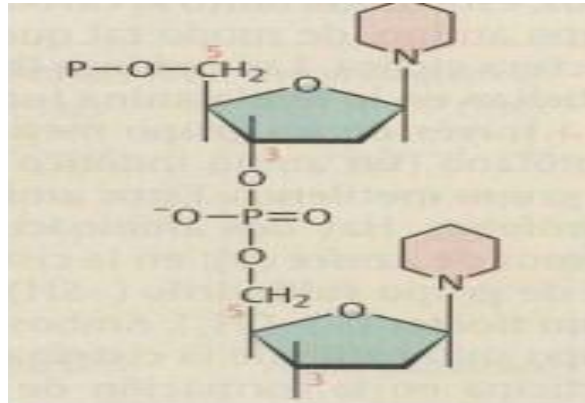


Figura 3. Estructura química Ácido nucleico⁴⁰.

Son las biomoléculas portadoras de la información genética. Son biopolímeros, de elevado peso molecular, formados por otras subunidades estructurales o monómeros, denominados Nucleótidos. De acuerdo a la composición química, los ácidos nucleicos se clasifican en Ácido Desoxirribonucleico (ADN) que se encuentran residiendo en el núcleo celular y algunos organelos, y en Ácido Ribonucleico (ARN) que actúan en el citoplasma. Los nucleótidos se forman a partir de la unión de: una pentosa, una base nitrogenada y ácido fosfórico⁴⁰.

- Pentosa: D-ribosa en el ARN o D-2- desoxirribosa en el ADN.
- Base nitrogenada:
 - Púrica: Guanina (G) y Adenina (A).
 - Pirimidínica: Timina (T), Citosina (C) y Uracilo (U).
- Ácido fosfórico: En la cadena de ácido nucleico une dos pentosas a través de una unión fosfodiéster. Esta unión se produce entre el C-3' de una pentosa, con el C-5' de la siguiente⁴⁰.

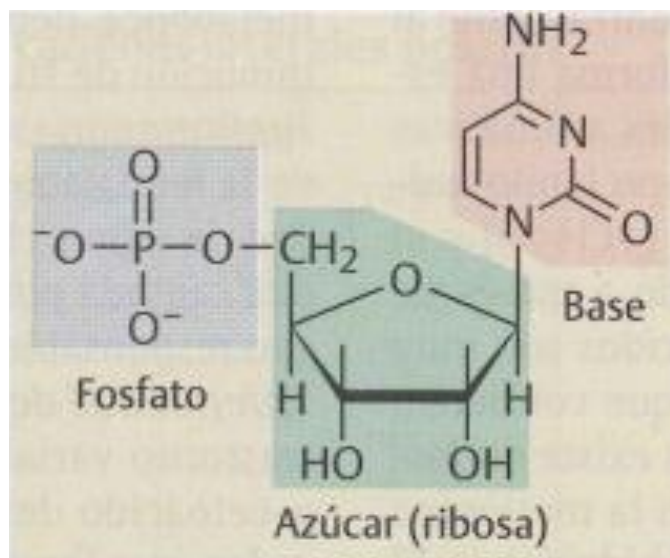


Figura 4. Estructura química de un Nucleótido (base + azúcar + fosfato)⁴⁰.

2.2.3.2 Importancia de los ácidos nucleicos

Todos los organismos poseen estas biomoléculas que dirigen y controlan la síntesis de sus proteínas, proporcionando la información que determina su especificidad y características biológicas, ya que contienen las instrucciones necesarias para realizar los procesos vitales y son las responsables de todas las funciones básicas en el organismo⁴⁰.

2.2.4 Electroforesis en gel

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas cargadas por migración en un campo eléctrico. Las moléculas se separan, desplazándose al electrodo de carga contraria y a mayor velocidad cuanto mayor es la carga de la molécula. Cada molécula se desplaza en el campo eléctrico alcanzando una velocidad constante. En el estado estacionario, la fuerza impulsora (fuerza del campo eléctrico) se equilibra con la resistencia al avance (fuerza de fricción hidrodinámica) en el medio en que se desplaza⁴¹.

Mediante la electroforesis podemos separar fragmentos de ADN y ARN en función de su tamaño, visualizarlos mediante una sencilla tinción, y de esta forma determinar el contenido de ácidos nucleicos de una muestra, teniendo una estimación de su concentración y grado de entereza⁴².

La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. Por su parte, la electroforesis en geles de poliacrilamida, aunque tiene una mayor limitación en cuanto al tamaño de los fragmentos que podemos separar (5-600 pb), posee un poder de resolución mucho mayor, permitiendo la separación de moléculas que difieren en un solo par de bases. Los geles de poliacrilamida se corren de forma vertical y tienen la desventaja de ser más complicados en su elaboración y manipulación. Los geles de agarosa tienen un poder de resolución mucho menor que los de poliacrilamida, porque no permiten separar moléculas de ADN que difieren en tamaño menos de unas 50 pb. Sin embargo, el rango de tamaños que pueden separarse es mucho mayor en un gel de agarosa (moléculas desde 50 pb hasta unas 40 kb) dependiendo de la concentración del mismo (0.3-2% p/v); cuanto más baja es la concentración de agarosa mayor es el tamaño de las moléculas que pueden separarse, y viceversa. Este rango de tamaños hace a los geles de agarosa ideales para analizar el producto de digestiones con enzimas de restricción. Los geles de

agarosa convencionales se corren en una cámara de electroforesis horizontal, con un campo eléctrico uniforme y constante.

La electroforesis en gel de agarosa no separa cromosomas enteros (los cromosomas de eucariotas inferiores tienen tamaños de entre 0.2 y 12 Mb). Además al reducir la concentración de agarosa hasta un 0.1 o 0.2% puede incrementar el límite de separación hasta los 750 pb, sin embargo estos geles son extremadamente frágiles y muy difíciles de manipular.

La agarosa es un polímero lineal compuesto de residuos alternantes de D-galactosa y 3,6-anhidro-L-galactosa unidos por enlaces glucosídicos $\alpha(1-3)$ y $\beta(1-4)$. Las cadenas del polímero de agarosa forman fibras helicoidales, que al solidificar forma una malla tridimensional de canales con diámetros entre 50 y >200 nm. Existen diferentes tipos de agarosa que se clasifican en función de la temperatura a la que se disuelven y solidifican. Las agarosas estándar se disuelven en el buffer a una temperatura de 90-95°C y solidifican a 35-45°C. Las agarosas de bajo punto de fusión se disuelven a unos 65°C y solidifican a 30-35°C. Existen además otros tipos, como las agarosas de alta fuerza de gel o las de baja viscosidad, que permiten respectivamente una mejor separación y un rango inferior del tamaño de las moléculas a separar. La concentración (p/v) de la agarosa es un parámetro de gran importancia pues determina el rango de tamaños en los que obtendremos una buena separación de los fragmentos de ADN⁴².

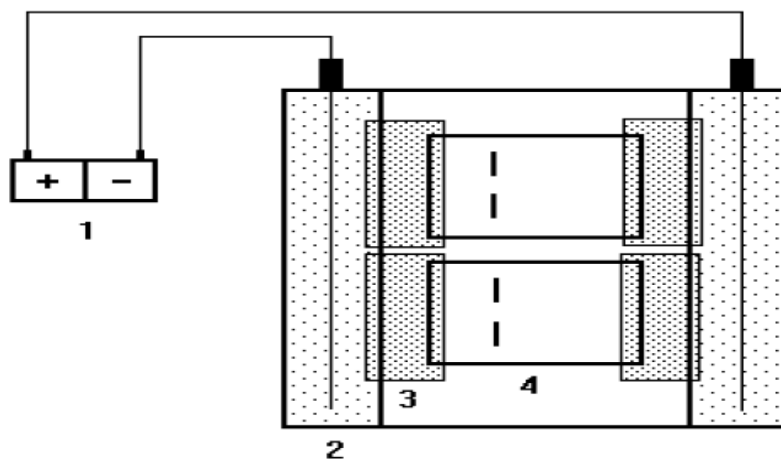


Figura 5.1: Partes básicas de una cámara de electroforesis en agarosa o poliacetato de celulosa. (1) Fuente de poder; (2) recipientes con electrodos sumergidos en el amortiguador; (3) puentes de contacto entre el amortiguador y el medio electroforético (ej. papel filtro, esponjas, etc.); (4) medio electroforético (agarosa o poliacetato de celulosa)⁴³.

2.2.5 Espectrofotometría

La medida del espectro de absorbancia A , que registra el espectrofotómetro obedece a la ley de Lambert-Beer.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l C = \frac{1}{T}$$

Siendo I_0 e I las intensidad de la luz incidente y transmitida respectivamente a través de una cubeta de longitud de paso óptico (l) que contiene una disolución de concentración C (molar), la constante de proporcionalidad ϵ se le llama coeficiente de extinción molar⁴⁴.

En los ácidos nucleicos, las bases nucleotídicas son los cromóforos, mientras que los azúcares y los fosfatos que constituyen el eje catenario, tienen sus transiciones a energías mayores. Las bases al ser protonadas, los espectros del DNA y RNA son sensibles al pH. A pH neutro, la absorción máxima es de 253 nm (guanósina) y 271 nm (citosina), por consecuencia, un polímero de DNA y RNA muestra una amplia y fuerte absorbancia a 260 nm. Como el espectro de absorción para un ácido nucleico es graficado por monómero, podemos esperar que el espectro de absorción sea el espectro promedio para las bases ponderadas que lo componen de acuerdo a la composición del polímero y modificadas por las interacciones. Las interacciones degeneradas dan una división y una redistribución de la intensidad, pero no un cambio neto en la intensidad⁴⁵.

2.2.6 Toxicidad y genotoxicidad

2.2.6.1 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)⁴⁶.

2.2.6.2 Genotoxicidad

Genotoxicidad es un término más amplio que se refiere a la capacidad de interactuar con el ADN y / o el aparato celular que regula la fidelidad del genoma, tales como el aparato del huso y la enzima topoisomerasa⁴⁶.

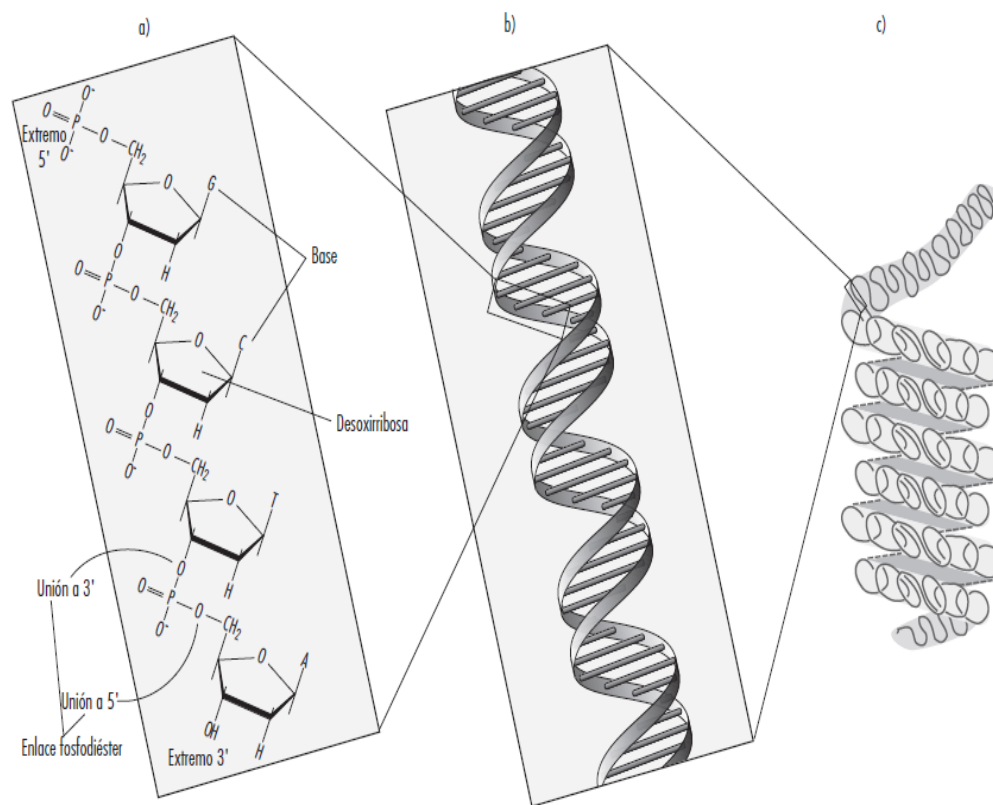


Figura 6. Organización de la información hereditaria en los seres humanos: a) primaria, b) secundaria y c) terciaria.⁴⁷

La cadena del DNA es un largo polímero no ramificado, compuesto únicamente por cuatro tipos de subunidades (desoxirribonucleóticos) adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T). Los nucleótidos están unidos por enlaces covalentes de tipo fosfodiéster entre el carbono 5' de un grupo desoxirribosa y el carbono 3'. Los cuatro tipos de bases están fijados a esta cadena de azúcar fosfato repetitiva, casi como cuatro tipos diferentes de cuentas ensartadas en un collar.⁴⁷

El arreglo de las bases sólo puede estar vinculado a través de puentes de hidrógeno. Watson comenzó a aparear las cuatro bases en todas las combinaciones posibles en donde las bases igual-con-igual se aparean mediante un par de puentes de hidrógeno y propuso un modelo estructural para el DNA y su mecanismo para su replicación⁴⁸.

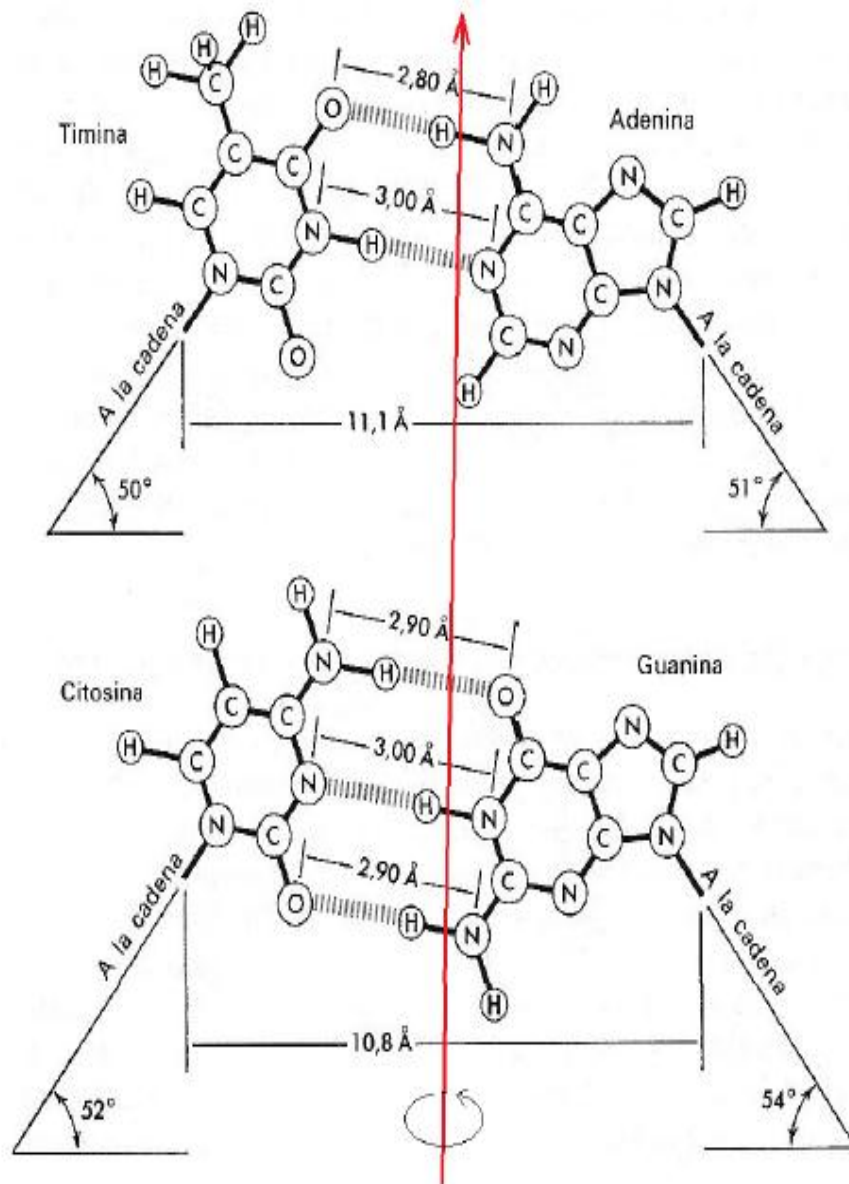


Figura 7. Apareamiento optimizado de las bases nitrogenadas A=T y G=C vía puentes e hidrógeno. El puente (guanina) N-H...O=C(citosina) no fue tenido en cuenta en el modelo original de Watson y Crick. Notar que el apareamiento confiere al DNA una serie de seudo - ejes dobles (o ejes diádicos) de simetría (línea en rojo), pasantes por el centro de cada par de bases y perpendiculares al eje común de las hélices⁴⁹.

2.2.6.3 Agente genotóxico

Se consideran tanto agentes químicos, físicos y biológicos los cuales se resumen a continuación en la siguiente figura⁵⁰.

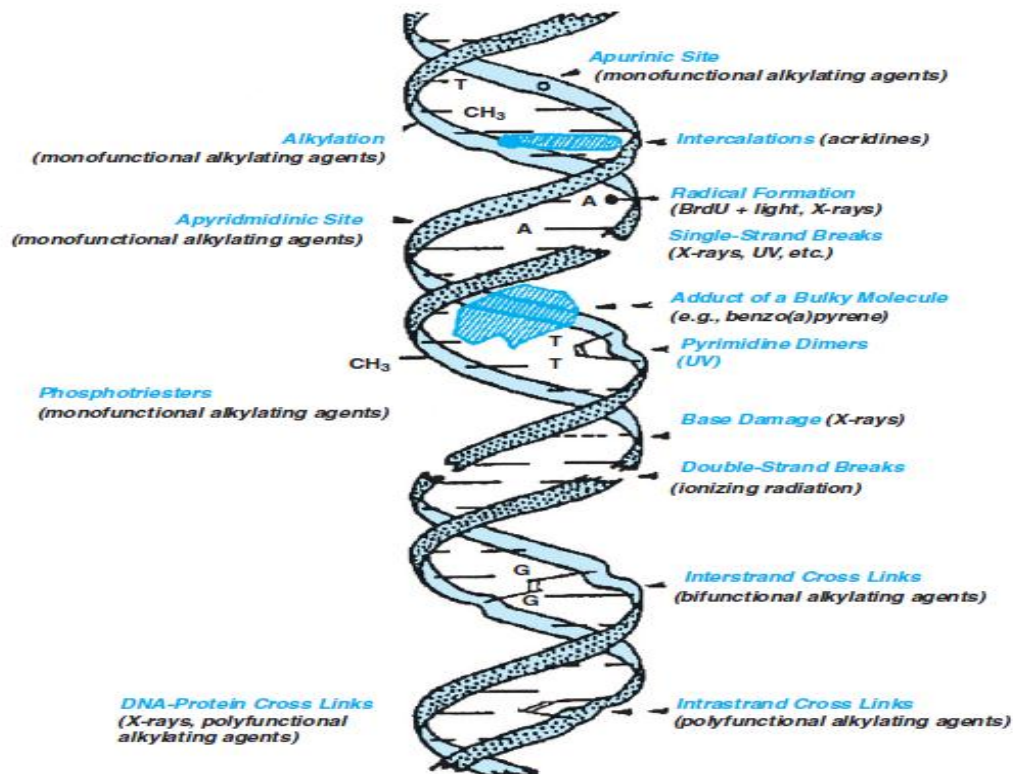


Figura 8. Efecto del daño inducido al DNA por agentes químicos, físicos y biológicos⁵⁰.

Los daños en el material genético pueden incluir:

- **Mutaciones puntuales o génicas**, los cuales son cambios en la secuencia de nucleótidos en uno o unos pocos segmentos codificadores de un gen. Dentro de esta podemos encontrar: Primero: sustituciones de pares de bases, como la incorporación de análogos de bases durante la replicación del DNA, alteraciones químicas de las bases, unión de compuestos químicos a las bases, modificaciones espontáneas de las bases. Y segundo, la adición o deleción de bases, los cuales son de origen espontáneo o son causados por proceso mutagénicos o durante los procesos de reparación de daños en el DNA⁵¹.
- **Mutaciones cromosómicas**, conocidas como aberraciones de la organización estructural normal del cromosoma. Resultan de la rotura, deleción, intercambio o reorganización de material cromosómico durante el

ciclo celular e incluyen inversiones de material cromosómico y translocaciones de material desde un cromosoma a otro⁵¹.

- **Mutaciones genómicas**, en el cual se observa cambios en el número de cromosomas de un genoma. En un núcleo diploide, la adición de un cromosoma resulta en trisomía y la deleción de un cromosoma, monosomía. Estos procesos pueden ser causados por la pérdida de cromosomas durante la división celular, como resultado de aberraciones cromosómicas o por una distribución irregular de la cromátidas entre las células hijas⁵¹.
- **Otros efectos en el DNA**, que determinan daños primarios en el DNA incluyen la reparación del DNA, recombinaciones mitóticas, conversión génica en mitosis e intercambio de cromátidas hermanas⁵¹.

2.2.6.4 Mecanismo de Genotoxicidad

La gran mayoría de los agentes genotóxicos necesitan una activación metabólica para interactuar con el DNA⁴⁶. En estos casos se forman productos intermedios de naturaleza electrofílicas, como los epóxidos o iones carbonio, los cuales son en sí la última instancia que inducen las lesiones en diversos lugares nucleófilos del material genético.

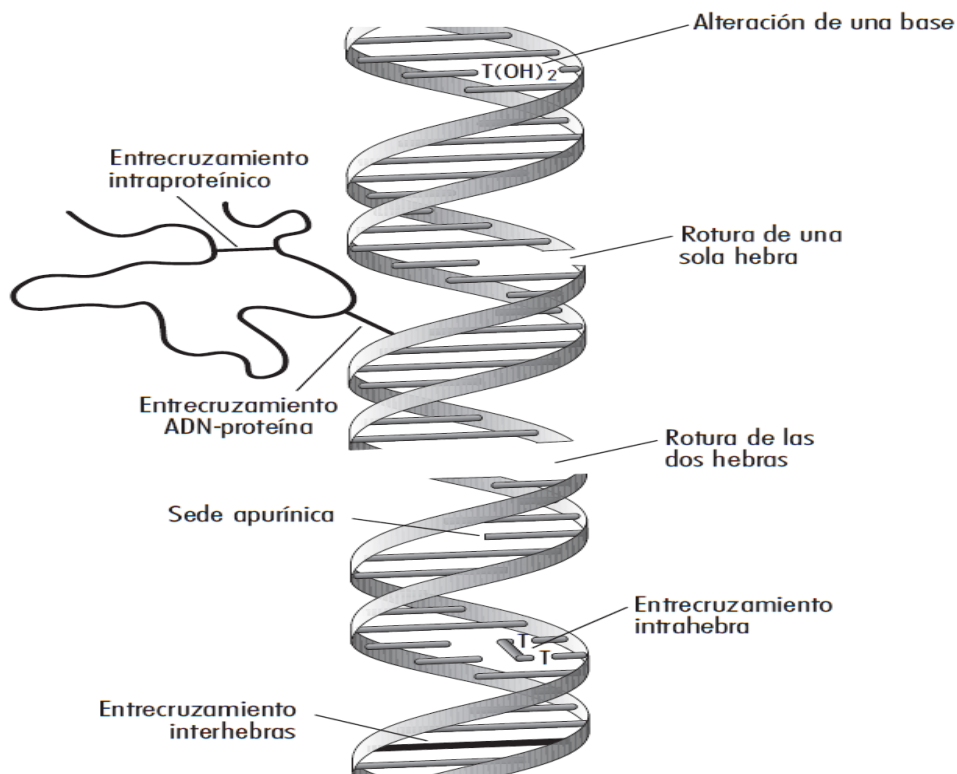


Figura 9. Diversos tipos de daño al complejo DNA-proteína considerados como los mecanismos de acción de la Genotoxicidad⁴⁷.

2.2.6.5 Evaluación de la genotoxicidad mediante ensayos *in vitro*

- **Test de mutación en bacterias o test de Ames (OECD TG 471):** En este ensayo se utilizan diversas cepas de *Salmonella typhimurium* que contienen una mutación. Con esta mutación, las bacterias son incapaces de crecer en un medio de cultivo determinado. Al tratarlas con un producto genotóxico, esta mutación puede revertir y facilitar su crecimiento en ese medio de cultivo. El número de colonias formadas es indicativo de la potencia genotóxica del agente en estudio⁵².
- **Ensayo de Micronúcleos (OECD TG 487):** En este ensayo se utilizan células de mamíferos. Cuando el DNA se fragmenta o los cromosomas no se separan correctamente durante la mitosis, pueden aparecer núcleos más pequeños que el núcleo original denominados micronúcleos. El tratamiento de las células con un agente genotóxico puede facilitar el aumento del número de estos micronúcleos. Este aumento es un parámetro indicativo de daño celular genotóxico⁵².
- **Ensayo de mutación génica en células de mamífero (OECD TG 476):** Este ensayo es similar al test de Ames descrito anteriormente, pero se lleva a cabo utilizando células de mamífero que poseen una mutación en el gen *hprt* o *xprt* en lugar de bacterias. Si el agente en estudio es genotóxico, esta mutación puede revertirse permitiendo a las células crecer en un medio concreto⁵².
- **Ensayo cometa**

La técnica de electroforesis en microgel que permite detectar el daño del DNA, las células embebidas en agarosa son colocadas en una placa para microscopio, las células son lisadas por detergentes y sales en altas concentraciones, el DNA es liberado, durante la electroforesis en condiciones neutras, las células con un incremento de roturas de doble cadena (DBS) incrementan la migración hacia el ánodo, la migración del DNA es cuantificada por tinción con bromuro de ethidio y cuantificada mediante la intensidad de fluorescencia⁵².

2.2.6.6 Ensayo cometa (EC)

El ensayo cometa, también denominado electroforesis de células individuales, es una técnica rápida, sensible y relativamente simple, que detecta daños en el ADN a nivel de células individuales. El ensayo cometa ha sido ampliamente estudiado con el fin de conocer sus ventajas y limitaciones en estudios de toxicidad genómica, ecológica y biomonitorización. Este método se basa en la

capacidad del ADN, de carga negativa, para migrar a través de un gel de agarosa en respuesta a un campo eléctrico hacia la carga positiva. El grado de migración de la molécula depende directamente de los daños en el ADN presente en las células⁵³.

El bioensayo cometa, también conocido como electroforesis alcalina de células individuales (del inglés: *Single Cell Gel Electrophoresis Assay*), es una prueba que evalúa el daño del material genético causado por diferentes agentes químicos y físicos⁵⁴.

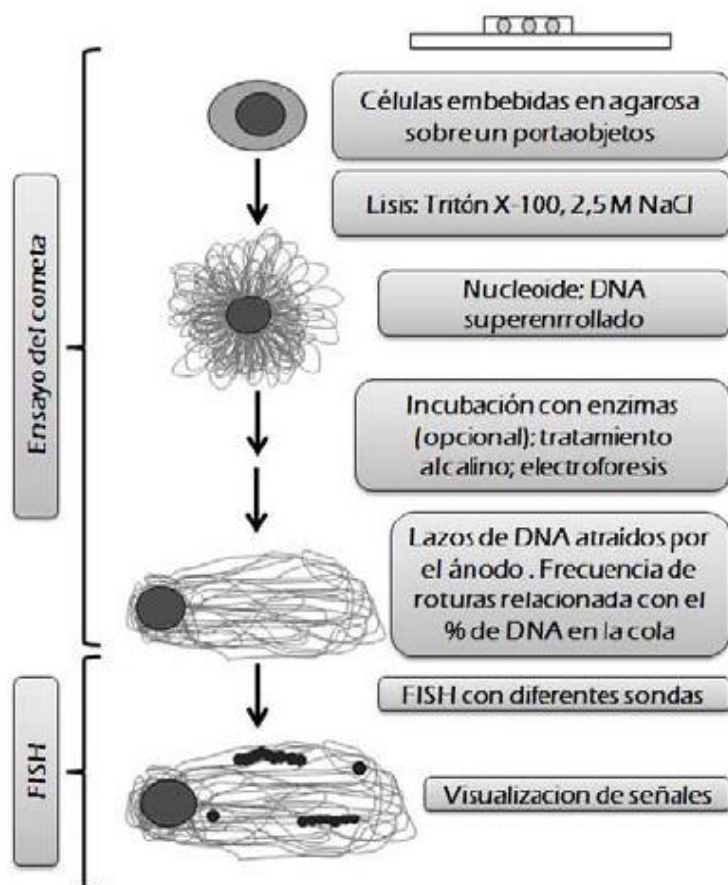


Figura 10 esquema de los principios generales de la formación de la cola del cometa bajo condiciones alcalinas⁵⁵.

Tabla 7 Detección mediante el tipo de ensayo cometa⁵².

ph	Medición del ensayo
7-8	Rotura de doble cadena, entrecruzamiento
12,1	Rotura de simple cadena , sitios de escisión de reparación , entrecruzamiento
12,5	Rotura de simple cadena, sitios de escisión de reparación , sitios álcalis débil, entrecruzamiento
>13	Rotura de simple cadena , sitios de escisión de reparación , sitios álcalis débil, entrecruzamiento

Tabla 8 descripción general de los diferentes modelos utilizados en el ensayo del cometa, sus características y aplicaciones⁵⁶.

Versión	Descripción / características	Ventaja/ aplicación
neutra	Lisis y electroforesis a pH 9,5 menos desnaturalización y colas menos pronunciadas, detecta SSB y DSB, Límite de detección similar, pero menos sensible que la versión alcalina.	Útil en situaciones donde es necesario no contar con tanta sensibilidad (eg cuando el daño basal o el inducido es alto)
Alcalina	Lisis / desnaturalización / electroforesis en condiciones alcalinas(pH mayor a 13) los ALS son convertidos a roturas , cambiando el pH de 9,5 a 13 se puede cambiar la sensibilidad	Imágenes más claras de los cometas, gran respuesta al daño comparada con la versión neutra, comúnmente llamado ensayo estándar del cometa, usualmente adoptado cuando se investiga protección frente a daño inducido eg H2O2
Con enzimas de reparación	Enzimas específicas usadas inmediatamente después de la lisis transforman los sitios susceptibles en SSB, los enzimas utilizadas incluyen EndoIII (revela pirimidinas oxidadas) se han incrementado la sensibilidad y reforzando la especificidad para distintos tipos de lesiones en el DNA	Se pueden detectar distintos tipos de daños, se ha reforzado la sensibilidad es útil por ejemplo para detectar diferencias del daño basal después de alguna suplementación.
Con proteinasa k	Refuerza la desnaturalización de DNA altamente condensado permitiendo que el daño sea detectado.	Permite que la detección de daño en el DNA en células espermáticas sea posible.
Cometa FISH	Utiliza genes marcados con fluorescencia y también puede ser usado para localizar y visualizar genes dentro de la estructura tridimensional de cromosoma.	Permite la investigación de dominios específicos de reparación ; pueden ser localizados genes específicos en la estructura tridimensional del cromosoma; puede medirse la tasa de reparación de un gen relativo al genoma completo

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Lugar de ejecución

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo entre los meses de mayo a julio del 2017, la identificación fue realizada por la Blga Laura Aucasime (Anexo 1); La identificación de metabolitos secundarios del látex del fruto de *Musa paradisiaca* L. “plátano” se realizó en el laboratorio de Farmacognosia “Jack Harrison Thiel” de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; la obtención de ADN de linfocitos humano y los ensayos de genotoxicidad se realizaron en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.(Anexo 1 y 2)

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

Frutos de *Musa paradisiaca* L. “plátano” de la comunidad Arizona 921,42 msnm, del distrito de Ayna, de la provincia La Mar, de la región de Ayacucho.

3.2.2 Muestra

5,00 Kg de frutos verdes (inicio de fructificación) de *Musa Paradisiaca* L. “plátano” de dos variedades: seda e isla, de la comunidad Arizona 921,42 msnm, del distrito de Ayna, de la provincia La Mar, de la región de Ayacucho

3.2.3 Muestreo

El muestreo se realizó por conveniencia (muestreo no probabilístico).

3.3 Unidad experimental

ADN de linfocitos humano y ADN de *Leishmania spp.* a 1500 ng/ μ L por ensayo.

3.4 Metodología y recolección de datos

3.4.1 Recolección de la muestra

Las muestras de *Musa paradisiaca* L. “plátano” fueron recolectadas en la comunidad de Arizona, en el distrito de Ayna, provincia de La Mar, de la región de Ayacucho a 941,42 msnm. Se recogió solo los frutos empleando un muestreo no probabilístico por conveniencia (buenos frutos y en fase vegetativa de fructificación de iniciación). Estas muestras fueron conservadas en un ambiente adecuado a temperatura ambiente.

3.4.2 Preparación del látex

En el laboratorio se obtuvo el látex por incisión, con hoja de bisturí, en el fruto verde de las dos variedades de plátano, y se realizó la preparación de las soluciones para el ensayo de Genotoxicidad.

3.4.3 Identificación fitoquímica del látex de *Musa paradisiaca* “plátano”

Se realizó una identificación fitoquímica cualitativa al látex del fruto de *Musa paradisiaca* L. “plátano”, para determinar la presencia de los metabolitos secundarios tales como: alcaloides y taninos. Las reacciones de identificación se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Miranda y Cuellar en el año 2000⁵⁷.

3.4.4 Extracción de ADN genómico a partir de linfocitos humano

Se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, contando con una unidad de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (para el desecho); la misma que se consiguió por donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, que se utilizó para la obtención del ADN de linfocitos con el protocolo descrito en Miranda⁷.

3.4.4.1 Procedimiento

- Transferir 1 ml de sangre de un tubo de centrifuga con tapa y adicionar 9 ml del tampón Tris– HCl 50 mM (pH 7.7).precalentado a 37 °C.
- Homogenizar e incubar a 37 ° C por 30 minutos, centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
- Descartar el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur dejando 1 ml del centrifugado en la parte inferior del tubo.
- Repetir los procedimientos 3 (esta vez con 5 ml de tampón Tris – HCl 50 mM (pH 7.7), 4 y 5 hasta tener un preparado claro.

- Adicionar 1 ml de centrifugado, 9 ml de solución salina (NaCl al 0.85%) homogenizar y centrifugar a 2500 rpm/ 10 minutos.
- Aspirar y descartar el sobrenadante dejando solo el sedimento, resuspender el sedimento en 0.5 ml de la solución HIGH TE (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 100 mM). Resuspender el sedimento y transferirlo a un tubo de microcentrífuga de 2 ml
- Adicionar 0.5 ml de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM).precalentada a 50 °C.
- Adicionar 10 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/ml) e incubar por una noche a 53 °C.
- Adicionar 1 ml de la solución Fenol saturado con Tris: cloroformo: alcohol isoamílico (25: 24: 1). Y homogenizar por inversión delicadamente durante 10 minutos.
- Centrifugar en la microcentrífuga por 10 minutos para separar las fases, luego aspirar la fase superior acuosa que contiene el DNA y transferirla a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 ml.
- Adicionar a la fase acuosa 1 ml de la solución de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1) y homogenizar por inversión durante 5 minutos. Centrifugar en la microcentrífuga por 10 minutos. Aspirar la fase acuosa que contiene el DNA y transferirla a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 ml.
- Repetir el procedimiento anterior hasta obtener una fase acuosa completamente clara.
- Adicionar la solución de Acetato de sodio 3M, pH 5.2. en cantidad igual a 1/10 del volumen de la fase acuosa.
- Adicionar un volumen de alcohol isopropílico helado y dejar en reposo por 1 hora en hielo. Luego centrifugar en la microcentrífuga por 15 minutos.
- Eliminar cuidadosamente el sobrenadante y enjuagar el sedimento con 1 ml de etanol al 70%.
- Centrifugar en la microcentrífuga por 10 min. Eliminar el alcohol y dejar secar el sedimento a medio ambiente.
- Resuspender el sedimento con 300 µl de la solución low TE (Tris HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM. Guardar en la nevera.

3.4.5 Ensayo de genotoxicidad *in vitro*

Se desarrolló siguiendo los protocolos descritos en Miranda, 2013⁵⁷ con las siguientes fases:

3.4.5.1 Fase de cuantificación de ADN genómico de linfocitos humano

Se realizó una cuantificación por espectrofotometría UV en eppendorf BioPhotometer plus del ADN de linfocito humano obtenido, se llevó esto a una concentración de 1500ng/ul en un volumen final de 150ul para la planta medicinal en estudio.

3.4.5.2 Fase de tratamiento de ADN genómico en estudio

- **Procedimiento**

Se preparó las soluciones de tratamiento del ADN.

Tabla 9. Preparación de las soluciones de tratamiento del ADN en estudio, con las diferentes concentraciones del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “seda” o “isla”.Ayacucho 2017.

Condiciones		Soluciones de tratamiento de ADN							
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6	7	8
						Blanco	Control	PK	M
ADN genómico en estudio (µL)		14	14	14	14	-	14	14	-
Látex	Concentración (%)	5	10	50	100	100		100	
	Volumen (µL)	6	6	6	6	14	-	3	
H ₂ O _d (µL)		-	-	-	-	6	6		
Proteinasa K								3	
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20	20	20	-
Marcador de tamaño molecular (50pb)		-	-	-	-	-	-	-	4
Incubación en baño maría a 37 C°		a 1 hora							

Este procedimiento se preparó hasta cuatro repeticiones, para cada caso del presente estudio.

3.4.6 Fase de electroforesis

3.4.6.1 Procedimiento

- Se preparó el gel de agarosa a 1.5% y se dispuso en una cámara de electroforesis Biometra.
- Para el volumen de carga en los pocillos del gel de agarosa, se utilizó las siguientes cantidades:
- 1 µL de *loading* (colorante señalizador de migración de las bandas), 7 µL de la solución de digestión para la prueba de genotoxicidad *in vitro* y 2 µL de agua bidestilada estéril, obteniendo un volumen final de 10 µL, se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.
- Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programó a 40 voltios (V) por dos horas y media de corrida.

3.4.7 Fase de lectura por radiación UV

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergió el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante una hora aproximadamente, se enjuagó con abundante agua corriente dos veces y para visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN productos de la genotoxicidad, se colocó el gel de agarosa en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*. (Anexo 14 y 15)

Adicionalmente se tomó 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, fueron basados en la clasificación del “ensayo cometa” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004), en tesis de Mónica Marisol Larrea Poma⁵⁸.

Tabla .10 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 Poma M, 2007⁵⁸.

3.5 Tipo de investigación

Básico-experimental.

3.5.1 Diseño de investigación

Tabla 11. Diseño de investigación

Grupo	Variedad de plátano	Tratamiento	Observación	
			ADN Humano	ADN Leishmania
G ₁	Seda	Marcador	O ₁	O ₁
		Control	O ₂	O ₂
		blanco	O ₃	O ₃
		5 mg/mL	O ₄	O ₄
		10 mg/mL	O ₅	O ₅
		50 mg/mL	O ₆	O ₆
		100 mg/mL	O ₇	O ₇
G ₂	Isla	Marcador	O ₁	O ₁
		Control	O ₂	O ₂
		blanco	O ₃	O ₃
		5 mg/mL	O ₄	O ₄
		10 mg/mL	O ₅	O ₅
		50 mg/mL	O ₆	O ₆
		100 mg/mL	O ₇	O ₇

3.6 Análisis de datos estadísticos

Los datos obtenidos fueron agrupados y presentados en tablas, expresado en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico R, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas y la prueba de Von Ferroni. El valor de $p < 0,05$ será considerado como el nivel estadísticamente significativo⁵⁹.

IV. RESULTADOS

Tabla 12 Identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “seda”. Ayacucho 2017.

Látex del plátano variedad Seda	Reactivo	Metabolitos ensayados	Observación	Resultado
Muestra	Dragendorf	Alcaloides	Formación de precipitado	++
Muestra	Wagner	Alcaloides	Formación de precipitado	++
Muestra	Mayer	Alcaloides	Formación de precipitado	++
Muestra	FeCl ₃	Fenoles y/o taninos	Coloración verde tenue	+++

Leyenda:

- +++ : Abundante
- ++ : Regular
- + : Escaso

Tabla 13 Identificación fitoquímica de los metabolitos secundarios del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla”. Ayacucho 2017.

Látex del plátano variedad Isla	Reactivo	Metabolitos ensayados	Observación	Resultado
Muestra	Dragendorf	Alcaloides	Formación de precipitado	+++
Muestra	Wagner	Alcaloides	Formación de precipitado	++
Muestra	Mayer	Alcaloides	Formación de precipitado	+++
Muestra	FeCl ₃	Fenoles y/o taninos	Coloración azul tenue	+

Leyenda:

- +++ : Abundante
- ++ : Regular
- + : Escaso

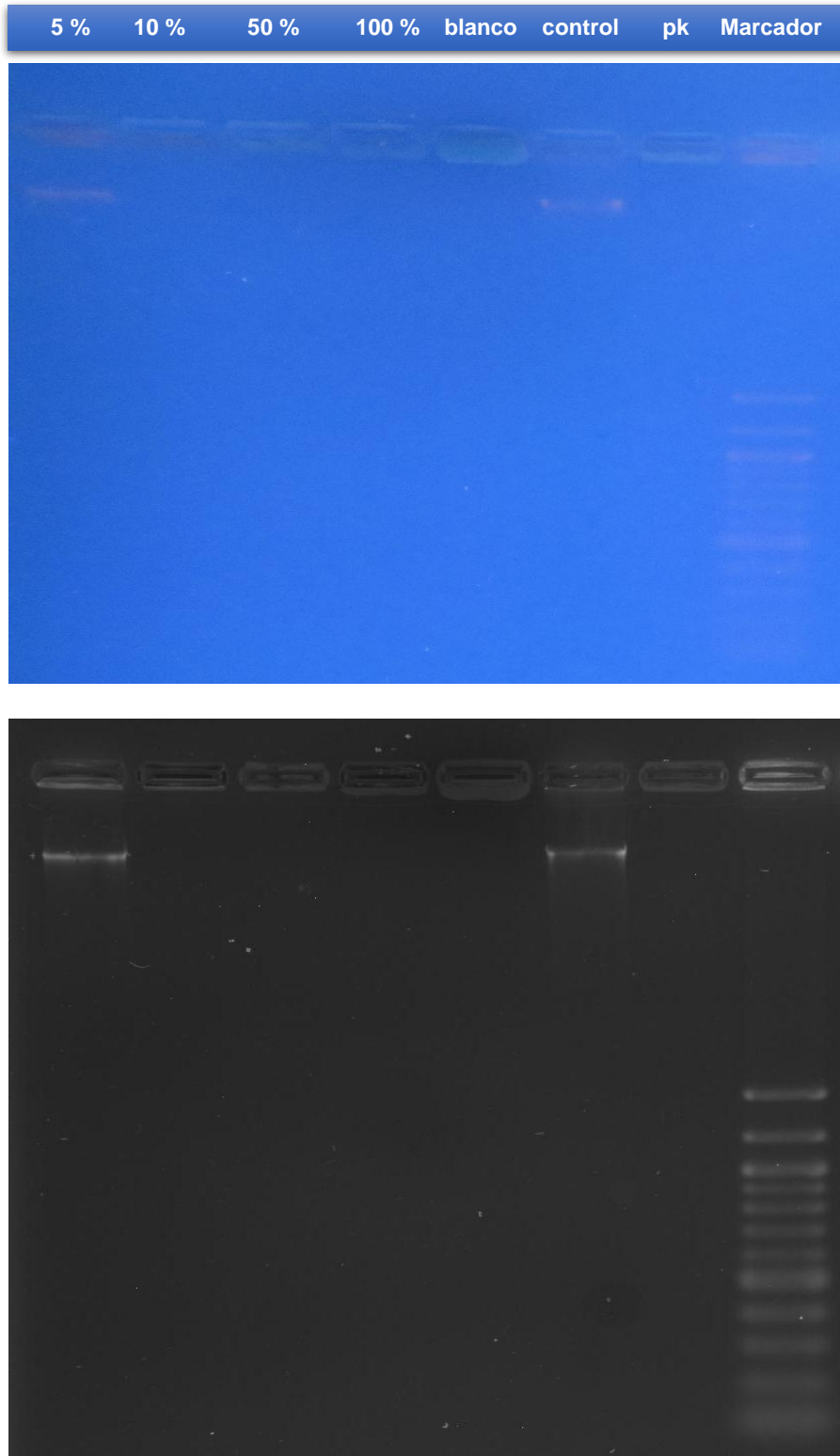


Figura 11. Efecto genotóxico del látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad "seda" a diferentes concentraciones, frente a ADN genómico humano en 1 hora de incubación a 37°C. Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática. UNSCH. Ayacucho Perú.

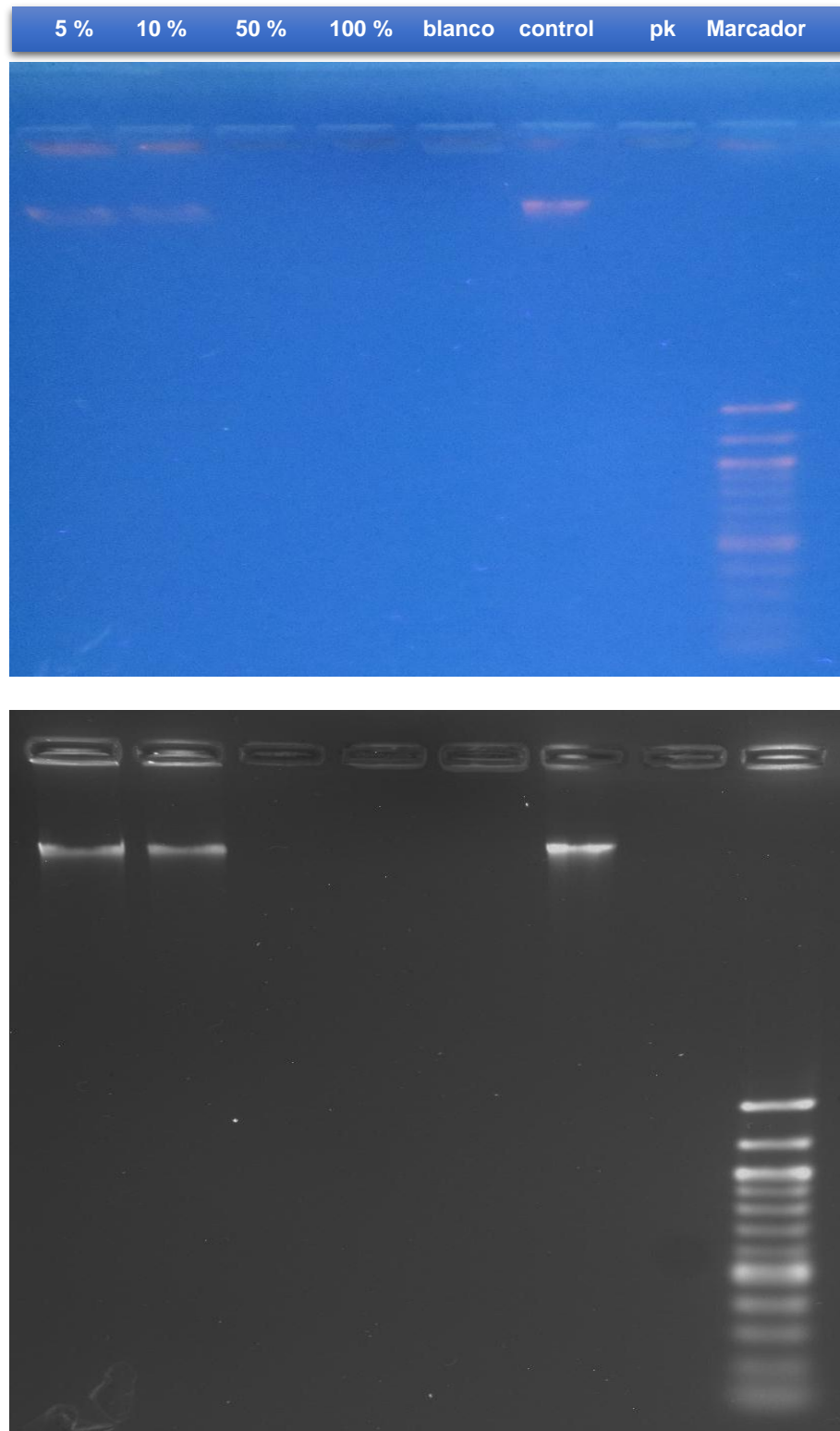


Figura 12. Efecto genotóxico del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla” a diferentes concentraciones, frente a ADN genómico humano en 1 hora de incubación a 37°C. Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática. UNSCH. Ayacucho Perú.

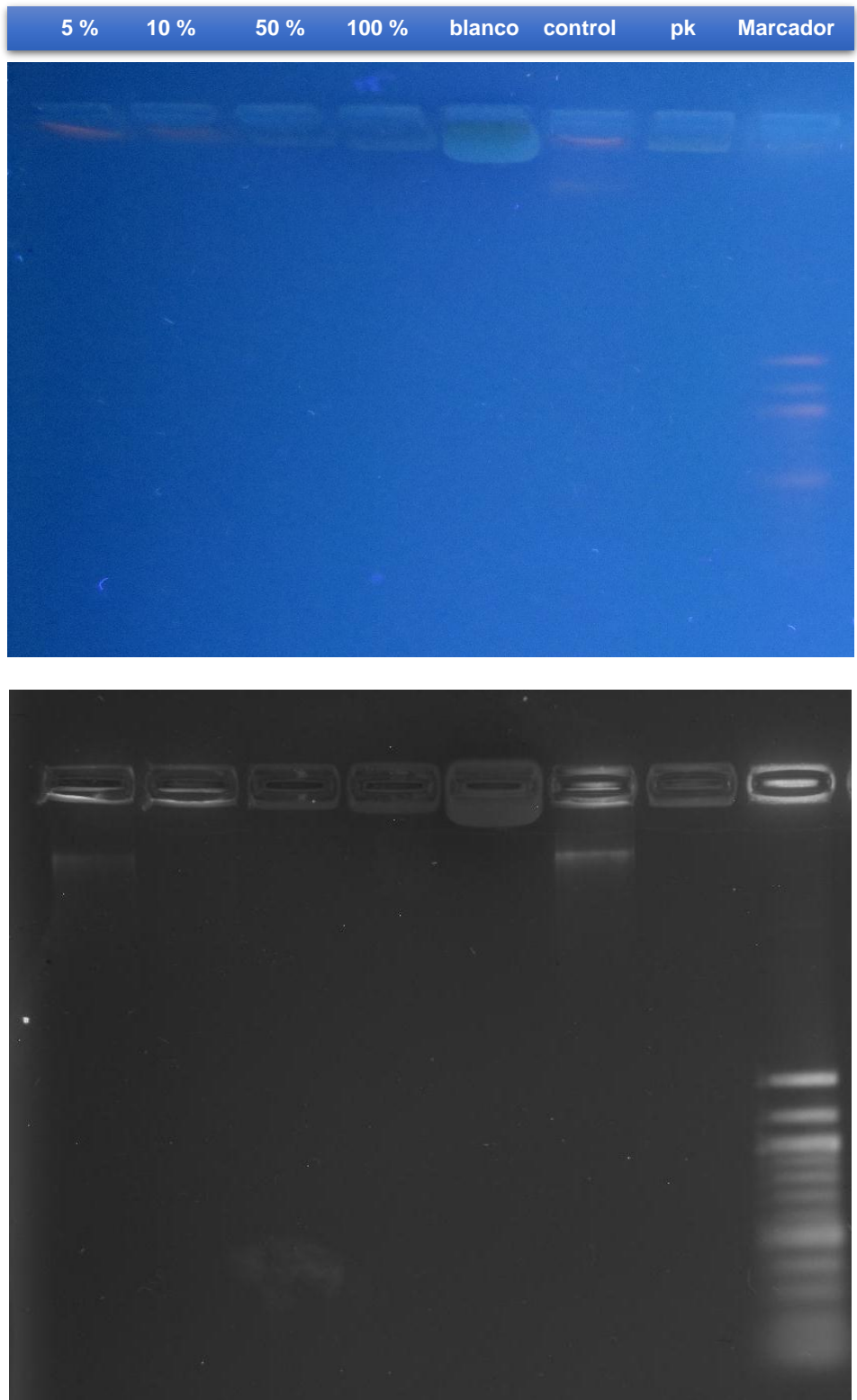


Figura 13. Efecto genotóxico del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “seda” a diferentes concentraciones, frente a ADN genómico de *Leishmania spp.* en 1 hora de incubación a 37°C. Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática. UNSCH. Ayacucho Perú.

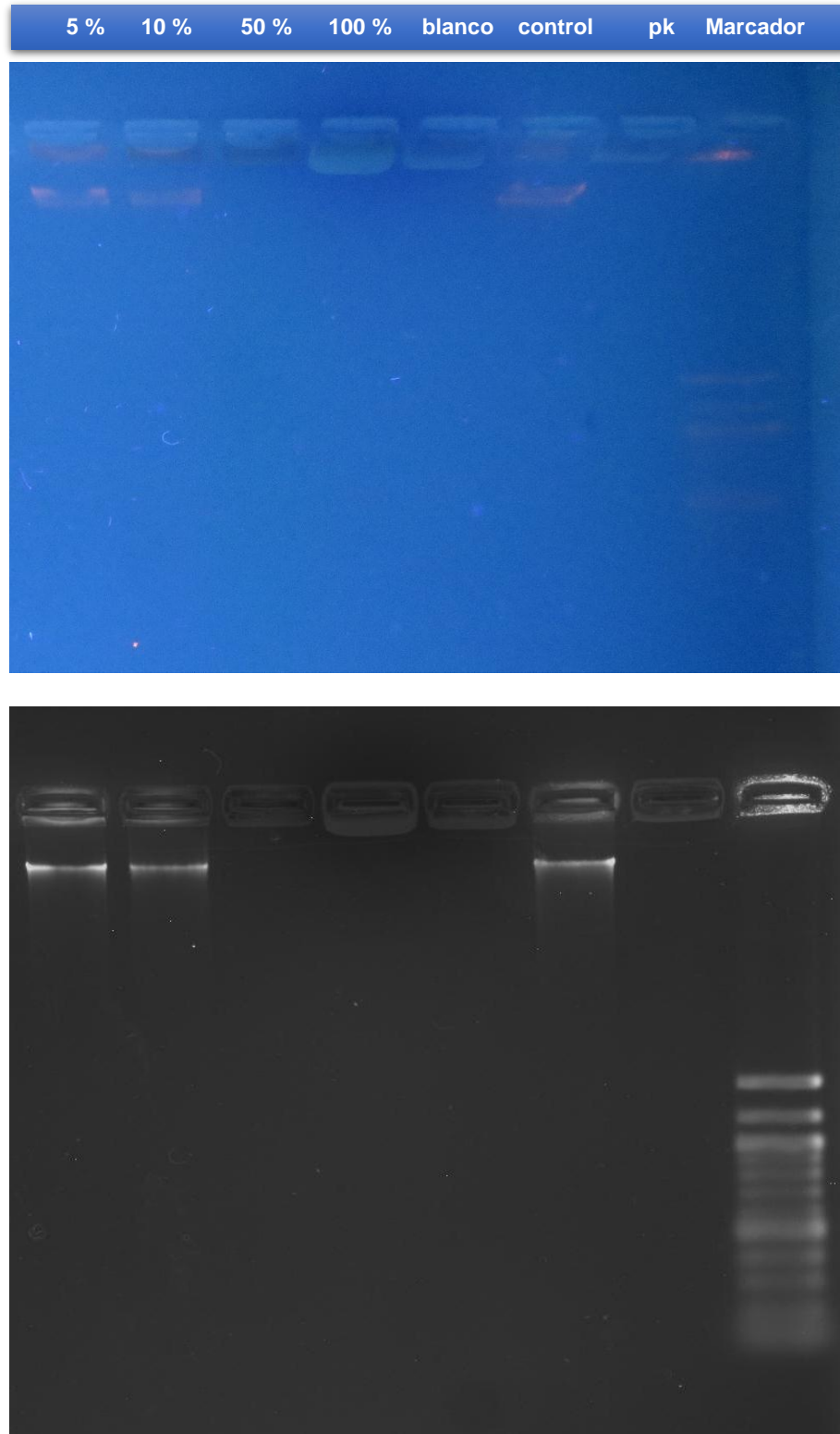


Figura 14. Efecto genotóxico del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla” a diferentes concentraciones, frente a ADN genómico de *Leishmania* spp. en 1 hora de incubación a 37°C. Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática. UNSCH. Ayacucho Perú.

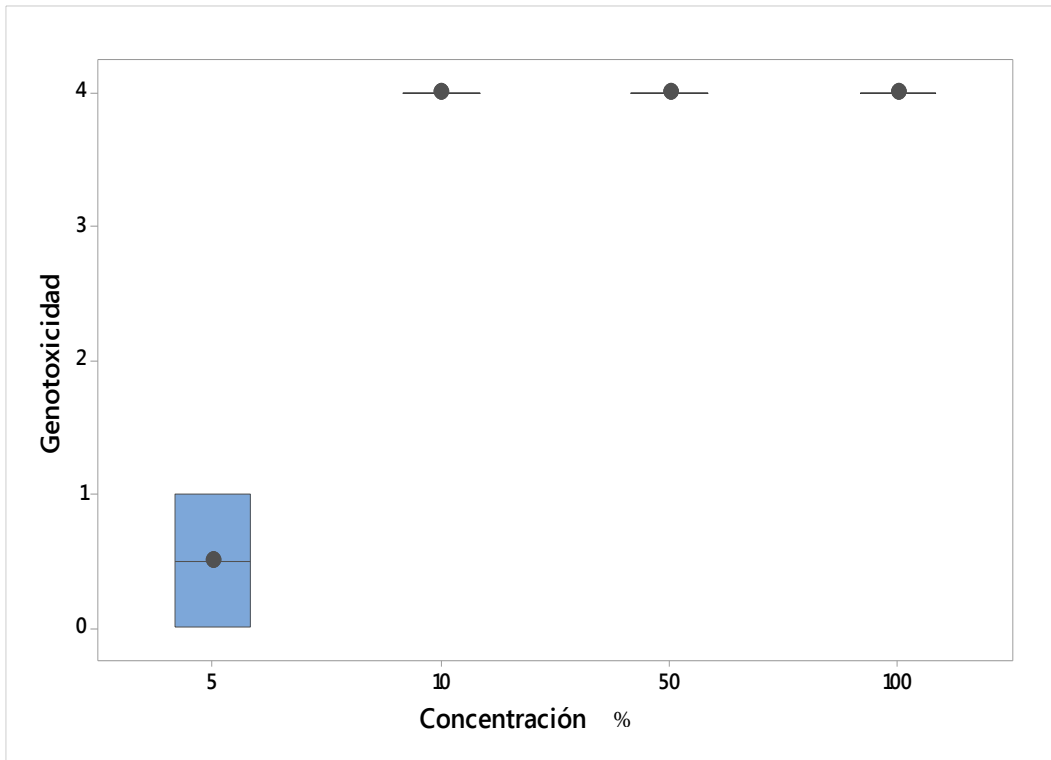


Figura 15. Prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.037$) para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad "seda" a diferentes concentración, frente al ADN genómico humano en 1 hora de incubación a 37 C°.

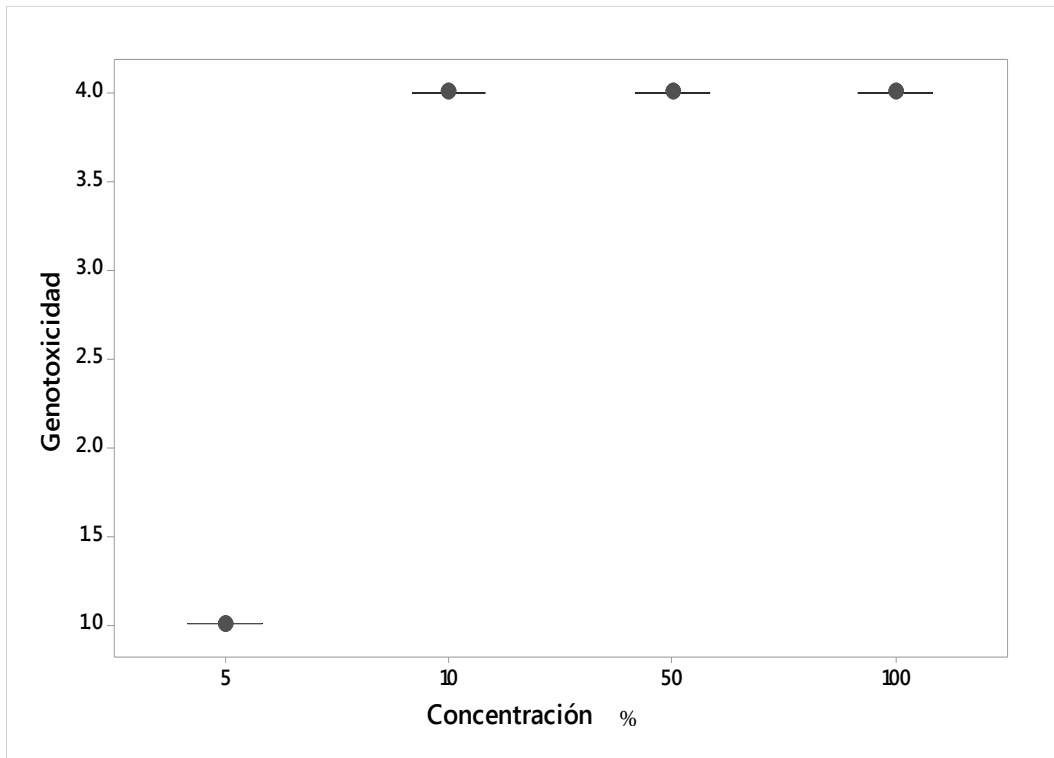


Figura 16. Prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.037$) para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad "seda" a diferentes concentración, frente al ADN genómico de *Leishmania spp.* en 1 hora de incubación

a

37

Cº.

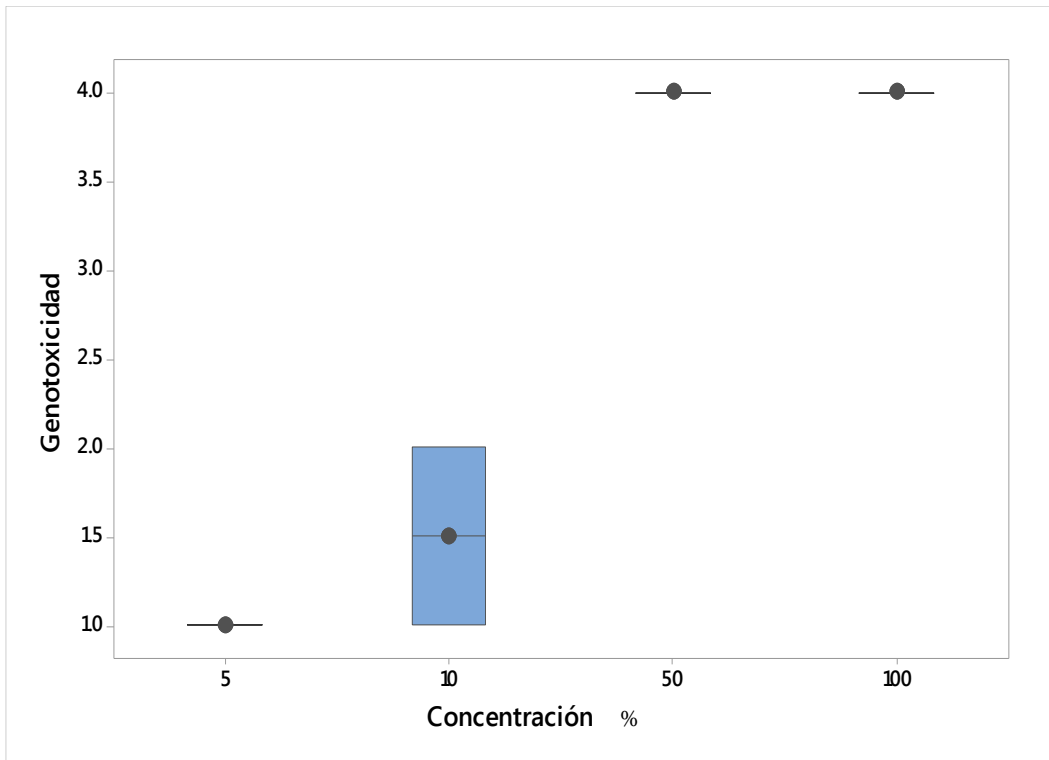


Figura 17. Prueba de Kruskal-Wallis ($p=0.009$) para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla” a diferentes concentración, frente al ADN genómico humano en 1 hora de incubación a $37^{\circ}\text{C}^{\circ}$.

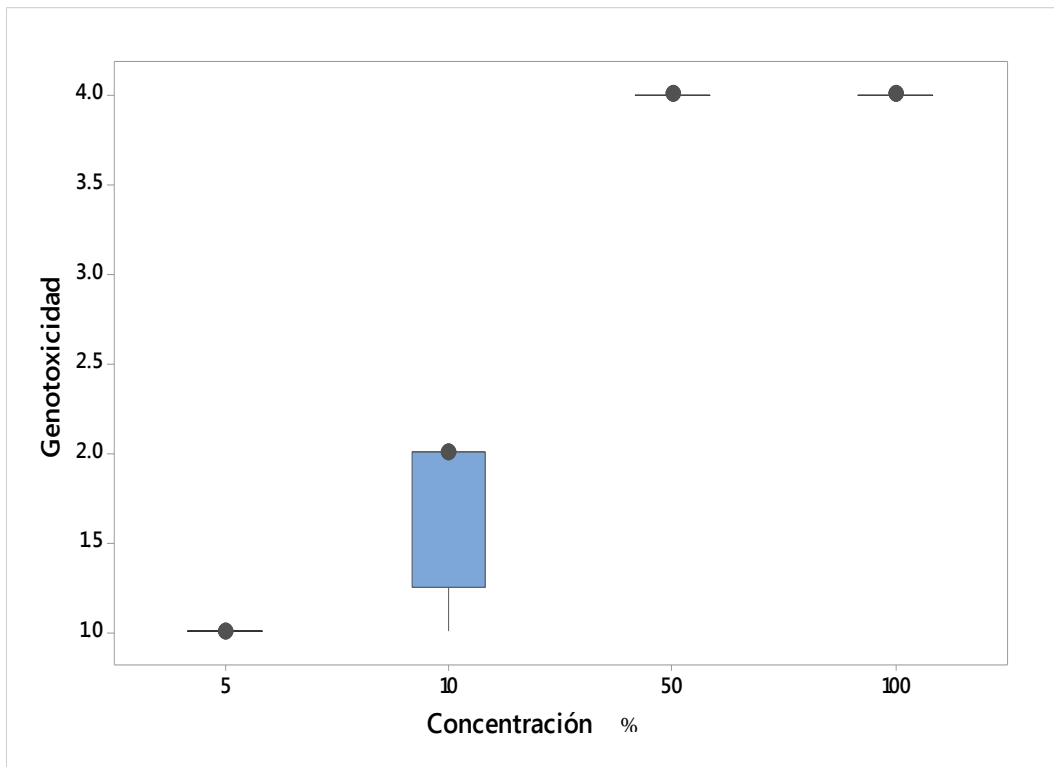


Figura 18. Prueba de Kruskal-Wallis($p=0.007$) para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla” a diferentes concentración, frente al ADN genómico de *Leishmania spp.* en 1 hora de incubación a 37 C°.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto genotóxico del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad seda e isla frente al ADN genómico humano y de *Leishmania spp.* debido a que en la actualidad, las bajas condiciones económicas y la poca accesibilidad de la población a instituciones de salud, permite revalorar el uso de plantas medicinales con acciones paliativas, preventivas o curativas sobre algunas afecciones o síntomas. Hoy en día la población humana valora las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales, sin tener en cuenta que estos metabolitos secundarios pueden tener efectos secundarios entre ellos aquel que puede causar daño a nivel del ADN (genotoxicidad) de las células del organismo que lo consume, por esta razón es muy importante demostrar el efecto genotóxico del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” frente al ADN humano y de *Leishmania spp.* Debido a que esta planta se usa tradicionalmente para el tratamiento de leishmaniosis cutánea.

La figura 11, muestra los resultados del ensayo de genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad seda, a diferentes concentraciones, frente al ADN genómico humano, luego de una hora de incubación en baño maría a temperatura de 37°C. El carril 1 con 5%, ha mostrado actividad genotóxica entre 5% a 20%, mientras que los carriles 2, 3, 4 que corresponde a las concentraciones de 10, 50 y 100% ha degradado totalmente al ADN, revelando una potente actividad genotóxica a estas concentraciones, todos ellos comparados con el ADN control del carril 6 y el marcador de tamaño molecular del carril 8, el carril 5 del látex puro que sirve como blanco, no muestra presencia de ADN. El carril 7 que contenía el látex, proteinasa K y ADN, revela que todo el ADN ha sido fragmentado, 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 serían destruidas por acción de la proteinasa K en el proceso de incubación.

La figura 12, muestra que el ensayo de genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad isla, a diferentes concentraciones, frente al ADN genómico humano, luego de una hora de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C. El carril 1 con 5%, ha mostrado actividad genotóxica entre 5% a 20% de fragmentación del ADN, el carril 2 con 10% ha fragmentado entre 5% a 40%, mientras que los carriles 3, 4 que corresponde a las concentraciones de 50 y 100% ha degradado totalmente al ADN, revelando una potente actividad genotóxica a estas concentraciones, todos ellos comparados con el ADN control del carril 6 y el marcador de tamaño molecular del carril 8, el carril 5 del látex puro que sirve como blanco, no muestra presencia de ADN. El carril 7 que contenía el látex, proteinasa K y ADN, revela que todo el ADN ha sido fragmentado, 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 serían destruidas por acción de la proteinasa K en el proceso de incubación.

Nuestros resultados ratifican lo demostrado por Baptista C. quien el 2007 evaluó el potencial mutagénico del extracto de la corteza de *Musa paradisiaca* en células sanguíneas en ratones albinos *in vivo*. Para esta evaluación, se utilizó el ensayo cometa y se utilizaron extractos de las siguientes concentraciones (1000, 1500 y 2000 mg / kg de peso corporal). El resultado en células de sangre periférica en el ensayo cometa mostró que el extracto de la corteza de *Musa paradisiaca* inducía estadísticamente aumento significativo en la cantidad de daño en el ADN de leucocitos en los dos mayores concentraciones del extracto, y mediante el ensayo de micronúcleo, también produce aumento significativo en los eritrocitos policromáticos⁸. Ya que en nuestro estudio las dos últimas de mayor concentración degradan totalmente al ADN.

La figura 13, muestra los resultados del ensayo de genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad "seda", a diferentes concentraciones, frente al ADN genómico de *Leishmania spp.* luego de una hora de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C. El carril 1 con 5%, ha mostrado actividad genotóxica entre 5% a 20%, mientras que los carriles 2, 3, 4 que corresponde a las concentraciones de 10, 50 y 100% ha degradado totalmente al ADN, revelando una potente actividad genotóxica a estas concentraciones, todos ellos

comparados con el ADN control del carril 6 y el marcador de tamaño molecular del carril 8, el carril 5 del látex puro que sirve como blanco, no muestra presencia de ADN. El carril 7 que contenía el látex, proteinasa K y ADN, revela que todo el ADN ha sido fragmentado, 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 serían destruidas por acción de la proteinasa K en el proceso de incubación.

La figura 14, muestra los resultados del ensayo de genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad "isla", a diferentes concentraciones, frente al ADN genómico de *Leishmania spp.* luego de una hora de incubación en baño maría a temperatura de 37 °C. El carril 1 con 5%, no ha mostrado actividad genotóxica entre 5% a 20% de fragmentación del ADN, el carril 2 con 10% ha fragmentado entre 5% a 40%, mientras que los carriles 3, 4 que corresponde a las concentraciones de 50 y 100% ha degradado totalmente al ADN, revelando una potente actividad genotóxica a estas concentraciones, todos ellos comparados con el ADN control del carril 6 y el marcador de tamaño molecular del carril 8, el carril 5 del látex puro que sirve como blanco, no muestra presencia de ADN. El carril 7 que contenía el látex, proteinasa K y ADN, revela que todo el ADN ha sido fragmentado, corroborando que este efecto fue por acción de los metabolitos secundarios, mas no por la actividad de nucleasas.

Así mismo, Hussain M. *et al.* el año 2010 evaluó la eficacia ovicida de las hojas de *Musa paradisiaca*, usados para el control de gusanos en el ganado ovino. Para este propósito, se llevó a cabo la prueba *in vitro* de eclosión de los huevos de nemátodos con extracto acuoso e hidroalcohólico de las hojas de la planta. La Concentración letal 50 (CL50) valores de eclosión de huevo fueron 0,0207 y 0,4813, respectivamente. Este estudio muestra que las hojas de *Musa paradisiaca* presentan actividad antihelmíntica *in vitro*¹⁰. Esta investigación corrobora la actividad genotóxica de la *Musa paradisiaca* frente a la *Leishmania spp.*

Por otro lado, Hashemi S. *et al.* el año 2011, demuestran que el látex de higuera podría inhibir la proliferación de línea celular de cáncer sin ningún efecto citotóxico sobre las células normales humanas. Se observó que 5 mg/ml era la concentración óptima en la inhibición del crecimiento línea celular¹¹.

La figura 15 es la representación gráfica de la Prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano"

variedad “seda” a diferentes concentración, frente al ADN genómico humano en 1 hora de incubación a 37 °C, resultando $p=0.037$, por tanto se acepta la hipótesis alterna, donde al menos una concentración manifiesta diferente efecto genotóxico con respecto a las demás; en este sentido la concentración a 5%, ha demostrado tener una fragmentación entre 5% a 20%, mientras que las concentraciones de 10, 50 y 100% ha fragmentado totalmente al ADN.

La gráfica de la figura 16, representa los resultados de la Prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “seda” a diferentes concentración, frente al ADN genómico de *Leishmania spp.* en 1 hora de incubación a 37 °C, resultando $p=0.037$, por tanto se acepta la hipótesis alterna, donde al menos una concentración manifiesta diferente efecto genotóxico con respecto a las demás; en este sentido la concentración a 5%, ha demostrado tener una fragmentación entre 5% a 20%, y las concentraciones de 10, 50 y 100% ha fragmentado totalmente al ADN; por tanto la concentración del látex si influye en el efecto genotóxico del mismo.

Quispe C. estudio el efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano. El látex de “papaya” desde 5% al 100% de concentración, presenta un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano; mientras que el extracto hidroalcohólico manifiesta una tendencia inversa, a mayor concentración del extracto la fragmentación del ADN es menor; y a menor concentración del extracto (5 mg/mL y 10 mg/mL), la fragmentación del ADN es mayor. Se concluye que e látex y el extracto hidroalcohólico de semilla, presentan efecto genotóxico *in vitro* frente a ADN genómico humano. Lo cual nos indica tomar precauciones frente al uso terapéutico de diferentes plantas medicinales y/o comestibles⁶⁰.

La figura 17 es la representación gráfica de la Prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla” a diferentes concentración, frente al ADN genómico humano en 1 hora de incubación a 37 °C, resultando $p=0.009$, por lo que se acepta la hipótesis alterna, que al menos una concentración manifiesta diferente efecto genotóxico con respecto a las demás; en este sentido las concentraciones a 5 y 10% ha demostrado tener una fragmentación entre 5% a 40% del ADN, y las concentraciones de 50 y 100% ha fragmentado totalmente al ADN.

La figura 18 es la representación gráfica de la Prueba de Kruskal-Wallis para la evaluación de la genotoxicidad del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla” a diferentes concentración, frente al ADN genómico de *Leishmania spp.* en 1 hora de incubación a 37 °C, resultando $p=0.007$, por lo que se acepta la hipótesis alterna, que al menos una concentración manifiesta diferente efecto genotóxico con respecto a las demás; en este sentido las concentraciones a 5 y 10% ha demostrado tener una fragmentación entre 5% a 40% del ADN, y las concentraciones de 50 y 100% ha fragmentado totalmente al ADN. Por tanto la concentración del látex si influye en su actividad genotóxica.

Pillaca L. realizó un estudio del efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”. Ambos látex presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico de linfocito humano, siendo a concentraciones de 100% y 50% con mayor efecto genotóxico con respecto a 25% y 10%. Se concluye que el daño genotóxico depende directamente de la concentración del látex; más no así del tiempo de incubación. Por lo tanto, el conocimiento de los beneficios y/o perjuicios del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” nos permite tomar precauciones ya que produce daño al ADN de *Leishmania spp.* y al del humano, esto nos induce a realizar más investigación para el uso terapéutico contra leishmaniasis cutánea a una concentración conocida⁶¹.

En el presente investigación con la prueba de Kruskal- Wallis se demuestra las roturas de ADN genómico humano por efecto del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano variedad seda e isla ya que el nivel de significancia es menor a 0,05 ($p<0,05$). Sin embargo no se conoce el mecanismo molecular de los alcaloides tropánicos y taninos que producen la fragmentación del ADN. Además con la prueba de Von Ferroni muestra que existe diferencia estadísticamente significativa entre las concentraciones que producen el efecto genotóxico a una confianza de 95%.

VI. CONCLUSIONES

- Se concluye que el látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedades “seda” e “isla” presentan una importante actividad genotóxica frente a ADN humano y de *Leishmania spp.*
- Los metabolitos secundarios identificados en el látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano”, variedad “seda” fueron de fenoles y/o taninos (+++) en abundante cantidad y alcaloides (++) en regular cantidad; mientras que en la variedad “isla” alcaloides (+++) en abundante cantidad y taninos y/o fenoles (+) en escasa cantidad.
- La genotoxicidad del látex de la variedad “**seda**”, revela la misma actividad frente al ADN genómico humano y ADN genómico de *Leishmania spp.*: con 5% de látex han fragmentado entre 5% a 20% del ADN; las concentraciones de 10%, 50% y 100 % de látex, han fragmentado totalmente al ADN. La actividad genotóxica del látex de la variedad “**isla**”, frente al ADN genómico humano y ADN genómico de *Leishmania spp.* mostró: con 5 % de látex han fragmentado entre 5% a 20% del ADN, con 10% de látex entre 20% a 40%, y las concentraciones de 50% y 100 %, han fragmentado totalmente al ADN.

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 nuevos principios activos para el tratamiento de las enfermedades.
- Ampliar estudios de genotoxicidad *in vitro* con otras plantas medicinales de uso común en nuestra región.

VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. García, C., Martínez, A., Ortega, J., Castro, F. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*. 2010. Vol. 2(1): 12-21.
2. Uribarren T. Leishmaniosis o Leishmaniasis, recursos en parasitología. Departamento de Microbiología y Parasitología. UNAM. 2016. Pág. 1-13
3. Dusinska M, Andrew R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*; 2005.
4. Angelis K; Dusinska M; Collins A. Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis*; 2004.
5. Chuang C. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay in vivo and white blood cells for in vitro assay. *Mutat Res. PubMed*; 2004.
6. 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.
7. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular-Guía de práctica. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2013
8. Baptista C. Mutagenicidade do Extracto de Casca de *Musa paradisiaca* (*Musaceae*) Em Células De Sangre Periférico de Camundongos In Vivo. Universidade José do Rosario Vellano Coordinacao de pesquisa e Pos-Graduacao. Alfenas MG.2007
9. Oduola, T. Ademosun, G B and Auwioro M.O. Use of *Jatropha gossypifolia* stem latex as a haemostatic agent: How safe is it?. *Journal of Medicinal*. 2007. *Plants research* vol. 1(1) pp -014-017.
10. Hussain, M. N. Khan, M. S. Sajid, Z. Iqbal, M. K. Khan, R. Z. Abbas, M. A. Raza and. Needham G.R. In Vitro Screening Of The Leaves Of *Musa Paradisiaca* For Anthelmintic Activity A. Department of Parasitology, University of Agriculture, Faisalabad-38040, Pakistan Department The *Journal of Animal & Plant Sciences* 20(1): 2010, Pages: 5-8 ISSN: 1018-7081 5

11. Hashemi S, Abediankenari S, Ghasemi M, Azadbakht M, Yousefzadeh Y. and Dehpour A. The Effect of Fig Tree Latex (*FicusCarica*) on stomach cáncerhine. Iran Red Crecent Medj. 2011 Apr; 13(4): 272-275.
12. .Prasa S.H.K.R and N. Jyothirmayi. Efficacy of Ripened and Unripened Fruit Extracts of *Musa X Paradisiaca L.* (Bontha Cultivar) Against Human Pathogens.Dept. of Biotechnology, K L University, Vaddeswaram, Guntur 522502, A.P, India, 2011.
13. Martins J. Estudo Do Potencial Cicatrizante, Antimicrobiano E Antiedematogénico Da *Musa paradisiaca L.*Universidade Federal De Alagoas. Escala de Enfermagen E Farmacia. Maestrado EM Enfermagen. Maceió. 2012.
14. Almeida P, Sousa S, Morales M, Benko A, Vidal A.Genotoxic potential of the latex from cotton-leaf physicnut (*Jatropha gossypifolia L.*). Genet Mol Biol. 2015 Mar;38 (1):93-100.
15. Ribeiro T, Sousa T, Arruda A, Peixoto N, Gonçalves P. y Almeida L. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity of *Hancornia speciosa* latex in *Allium cepa* root model. Braz J Biol. 2016 Jan 22.
16. Hidalgo W. Biosynthesis of phenylphenalenone-type compounds in Haemodoraceae plants and their phytopathological role in the interaction *Musa - Mycosphaerella fijiensis*. Tesis Master of Science. Universitat Jena. Colombia.2015.
17. Cárdenas F. Estudio del Mercado de la cadena de plátano. Ministerio de Agricultura. Perú. 2009. Pág. 57.
18. Araya J. Agrocadena de Plátano. Caracterización de la Agrocadena. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Huerta. Norte. 2008. Pág. 51-67.
19. Dreosti I. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. Nutrition 16 (7-8), 692-694.
20. Johnson I. Antioxidants and anticarcinogens. Eur J Cancer Prev, 7 Suppl 2, S55-62
21. Robards K, Prezier P, Tucker G, Swatsitang P. y Glover W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. Food Chemistry 66: 401-436

22. Waterman P. y Mole S. Analysis of Phenolic Plant Metabolites. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 1994.
23. Torras L. Estudi i caracterizació de metabòlits secundaris: compostos fenòlics i alcaloides. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia. 2007
24. Ugartondo V. Caracterizació de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. 2009
25. Beltrán C. y Vela S. Mitos, Creencias y prácticas en cuidadores de niños con asma respecto al tratamiento con inhaladores en Chiclayo, Perú-2013. Tesis de Grado. Universidad católica Santo Toribio de Mogrovejo. Perú. 2015.
26. Sanchez L. “Las euforias de canarias” (<http://www.rinconesdelatlantico.com/num2/euforbias.html>) consultado en 2016.
27. Boletín Oficial de Canarias (BOC). “BOC N° 108. Viernes 3 de junio de 2005 - 1919”
28. Iman MZ, Akter S, *Musa paradisiaca* L. and *Musa sapientum* L. A phytochemical and pharmacological. Review J APP Pharm Sci. 2011.
29. Lewis DA, Fields WN, Shaw GP, A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L var *paradisiaca*) protect the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. Ethnopharmacol 1999. 65:283:8
30. Ngo P, Dvorkin L, Whelam J, *Musa paradisiaca*. Herbal Index, Boston healing landscape proyect. Disponible em: www.bu.edu/bhlp/pages/herb_monographs/musa_paradisiaca.htm
31. Lainson, R., Shaw, J., Silveira, F., De Souza, A., Braga, R. Ishikawa, E. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1994; 89: 435-443.
32. Pereira A y Pérez M. Leishmaniosis. Parasitología Universidad de Santiago. Facultad de Farmacia vol 21 núm 9 octubre 2002

33. Vexenat, J. A., Barreto, A. C., Rosa, A. C. Infecção experimental de *Leishmania whitmani*, em cães infectados com *Leishmania braziliensis*. Revista da Sociedade de Brasileira de Medicina Tropical. 1986; 19: 80. Suplemento].
34. Aragão, H. Leishmaniose tegumentar e sua transmissão pelos phlebotomos. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 1927; 20: 177-186.
35. Ampuero J. Factores de risco para a transmissão de leishmaniose cutânea em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Tese de Mestrado. Universidad de Brasilia. Brasil. 1996.
36. Ministerio de Salud de Brasil. Fundación Nacional de Salud. Guía de control de la leishmaniasis tegumentaria americana. Brasil. 1991.
37. Sánchez L, Sáenz E, Pancorbo J3, Zegarra R, Garcés N, Regis A Leishmaniasis Dermatología Peruana 2004; vol 14: No 2
38. Rondón AJ. Leishmaniasis tegumentaria americana. En: Rondón Lugo AJ. Temas Dermatológicos. Pautas diagnósticas y terapéuticas. Caracas:Tipografía Olímpica CA. 2001:262-9.
39. Mandell KJ, Douglas RM and Bennett`s JE. Principles and practice infectious diseases. Eighth edition. Philadelphia.Volumen 1. ISBN 978-1-4557-4801-3. 2015
40. Passarge E. Genética, 2da edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. 2002.
41. Departamento de Biología de Sistemas. Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS "SDS-PAGE" Universidad de Alcalá. Guion de Práctica. 2016.
42. Fierro F. Herramientas moleculares aplicadas en ecología. Electroforesis de ADN. México ISBN: 978-607-8246-72-4. 2014.
43. Lomonte, B. Manual de Métodos Inmunológicos, 138 pp. Universidad de Costa Rica. Acceso libre en: <http://www.icp.ucr.ac.cr/~blomonte/>. 2007.
44. Vargas R, Rangel LF, Cañola E A, Rodríguez E L, Klinger JC, Bastidas AE. Detección y cuantificación de niveles de ADN circulante en suero humano utilizando espectrofotometría UV visible. GOA Unversidad de Valladolid España. Revista Colombiana de Física, vol. 38, No. 2. 2006.

45. Arenas I, López JL, Espectrofotometría de Absorción. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Junio de 2004.
46. IEH (2002). *Assessment of Chemical Carcinogens: Background to General Principles of a Weight of Evidence Approach*. 17 pp. Leicester, UK: Medical Research Council. Website:
47. Silbergeld E. Toxicología. Enciclopedia de Salud y seguridad en el Trabajo. Edición 33.
48. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K. y Watson James. Biología molecular de la Célula. Ediciones Omega. Tercera Edición. Barcelona.2002. Pág. 102-116.
49. JD Wtason TA, Levine & Losick. Biología Molecular del gene. Quinta edición. Editorial Medica Panamericana.2006.
50. Curtis K. Casarett. Doullarett and Doulls Toxicology The basic Science of Poisons.2011.
51. De la Peña y Cols. Mutagénesis y carcinogénesis química. En M, Repetto (ed) postgrado en Toxicología. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla. CD-ROM.2012. ISBN:13:978-84-695-3142-6. Depósito legal: SE-1047-08.
52. Bailón NC. Análisis de la actividad antigenotóxica de la savia de Musa paradisiaca en células de ovario de hámster chino mediante intercambio de cromatidas hermanas y ensayo cometa. Universidad de cuenca, Facultad de ciencias químicas, Escuela de bioquímica y farmacia. Cuenca- Ecuador .2005.
53. Medrano C. "evaluación de la genotoxicidad de un compuesto del extracto de Proallium AP® mediante el ensayo cometa con potencial uso en el envase alimentario. Departamento de Nutrición y Bromatología. Área de Toxicología. 2016.
54. Rodríguez A, Noris-E, Fundora MT. Principios y relevancia del ensayo cometa. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba. Revista Cubana de Investigaciones Biomédica 2016;35(2):184-194.

55. Shaposhnikov S. E. Frengen A, Collins. Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization-a review. *Mutagenesis*, 24:383-389. 2009.
56. Zuñiga L. Optimizaciones metodológicas del ensayo cometa y su aplicación en biomonitorización humana. Universidad autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de genética y de Microbiología, 2009.
57. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad de la Habana. Ciudad de Habana. Cuba; 2000.
58. Larrea Poma M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2007.
59. Hernández R, Fernández C, Baptista P. Metodología de la Investigación. 5ta edición. Perú: Editorial Mc Graw Hill. 2010.
60. Quispe C efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano. 2015
61. Pillaca L. Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”. 2015

ANEXOS

Anexo 1. Certificación de clasificación taxonómica de *Musa paradisiaca* L. "Plátano". Variedad seda. 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. Tania, **MENDOZA ALMEIDA**, 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	:	LILIOPSIDA
SUB CLASE	:	ZINGIBERIDAE
ORDEN	:	ZINGIBERALES
FAMILIA	:	MUSACEAE
GENERO	:	Musa
ESPECIE	:	<i>Musa acuminata</i> Colla.
Sinonimia	:	M. sapientium L.
Variedad	:	Seda ó guayaquil
N.V.	:	" plátano de seda"

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

Ayacucho, 08 de Agosto del 2016

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

Dña. Laura Susana Méndez
JEFE

Anexo 2. Certificación de clasificación taxonómica de *Musa paradisiaca* L. "Plátano". Variedad isla. 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. Tania, MENDOZA ALMEIDA**, 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	:	LILIOPSIDA
SUB CLASE	:	ZINGIBERIDAE
ORDEN	:	ZINGIBERALES
FAMILIA	:	MUSACEAE
GENERO	:	<i>Musa</i>
ESPECIE	:	<i>Musa acuminata Colla.</i>
Sinonimia	:	<i>M. sapientium</i> L.
Variedad	:	Isla
N.V.	:	" plátano de isla"

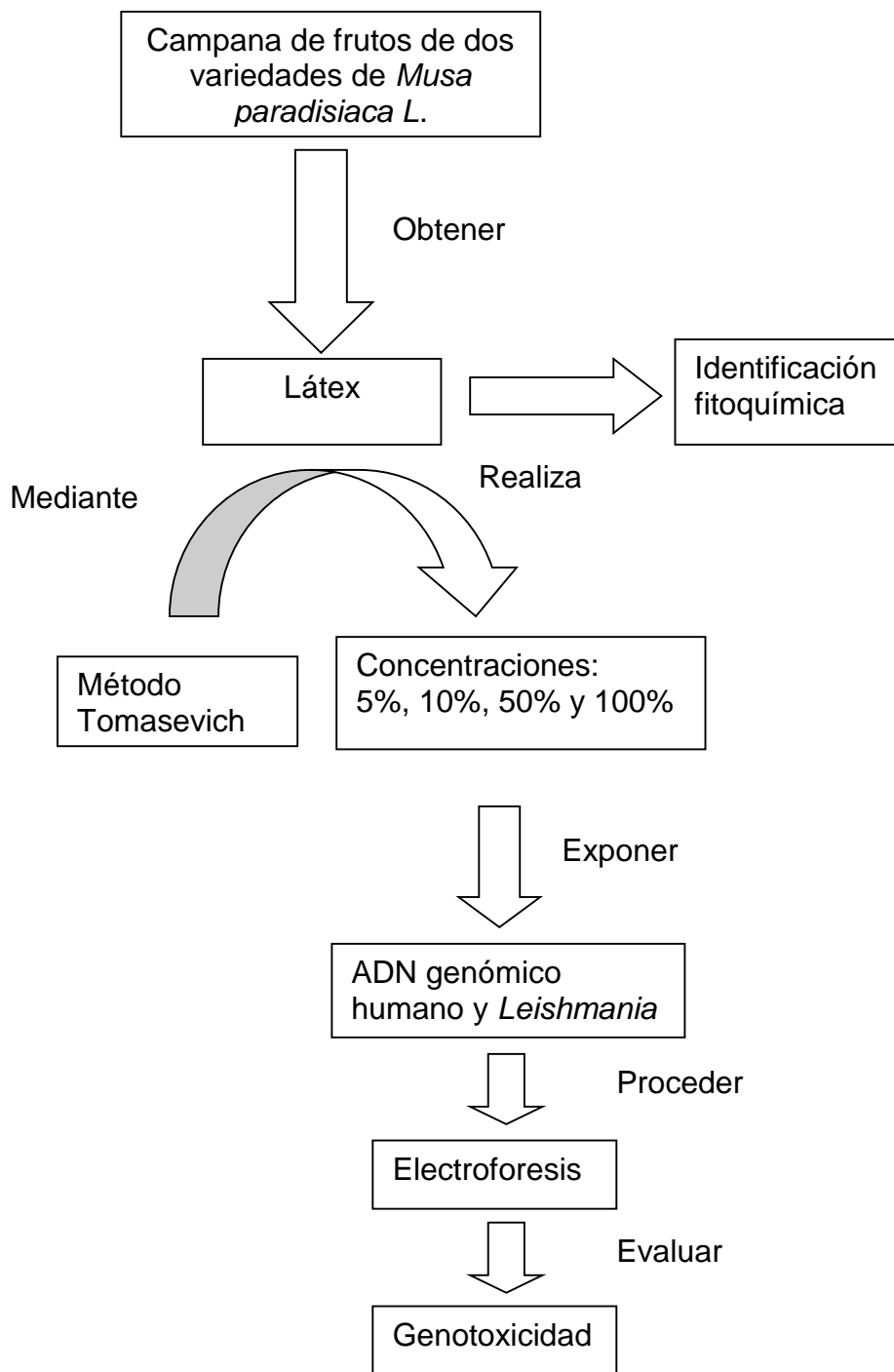
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 08 de Agosto del 2016

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

Dpto. Ayacucho, 2016

Anexo 3. Esquema del ensayo Genotoxicidad *in vitro* del látex de dos variedades de *Musa paradisiaca* L. "plátano" frente a ADN humano y de *Leishmania* spp. Ayacucho. 2017



Anexo 4. Campana de frutos de ambas variedades de *Musa paradisiaca* L. "plátano". Ayacucho 2017.



Fruto de *Musa paradisiaca* L. "Plátano" variedad seda.



Fruto de *Musa paradisiaca* L. "Plátano" variedad isla.

Anexo 5. Obtención del látex de *Musa paradisiaca* L. "Plátano". Ayacucho 2017.

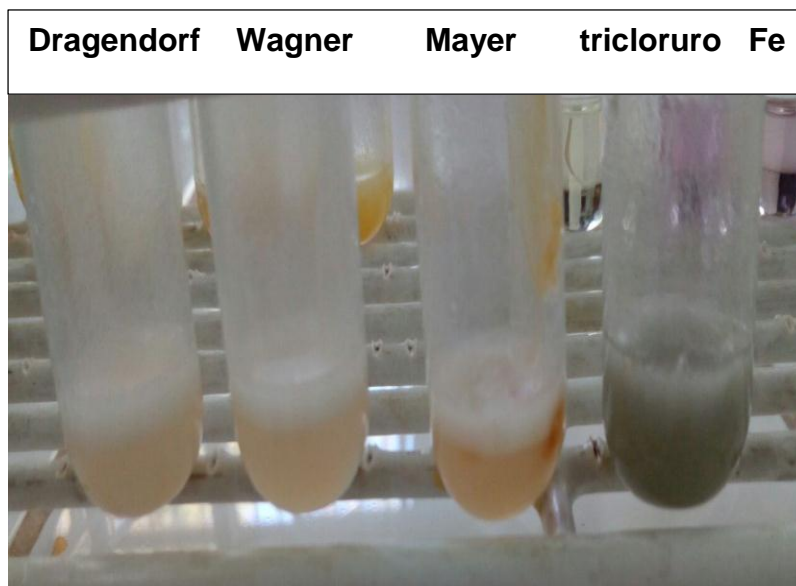


Látex del fruto no maduro de *Musa paradisiaca* L. "Plátano" variedad seda

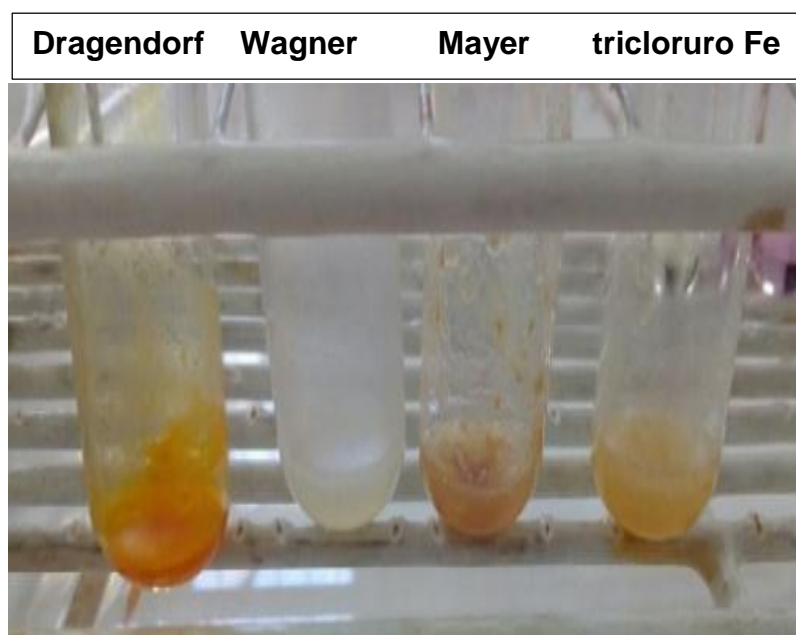


Látex del fruto no maduro de *Musa paradisiaca* L. "Plátano" variedad isla.

Anexo 6. Identificación fitoquímica del Látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad seda e isla Ayacucho. 2017.

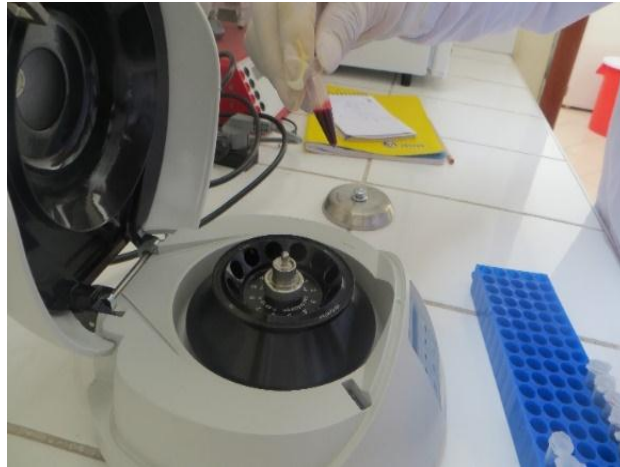


Identificación fitoquímica del Látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad seda



Identificación fitoquímica del Látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad isla.

Anexo 7. Extracción de ADN Genómico de linfocitos humanos. Ayacucho 2017.



El tubo eppendorf que contiene los linfocitos humanos es centrifugado



ADN genómico humano extraído en tubos eppendorf.

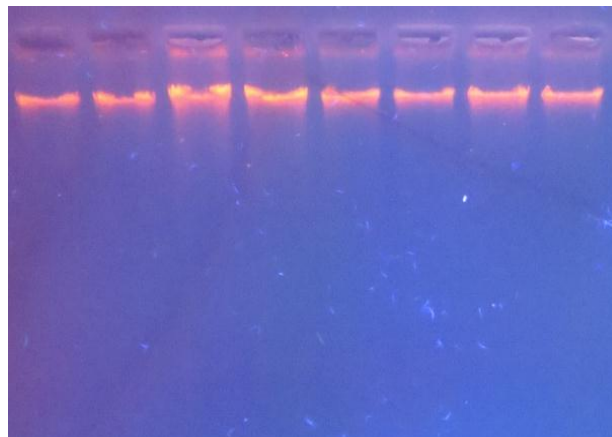
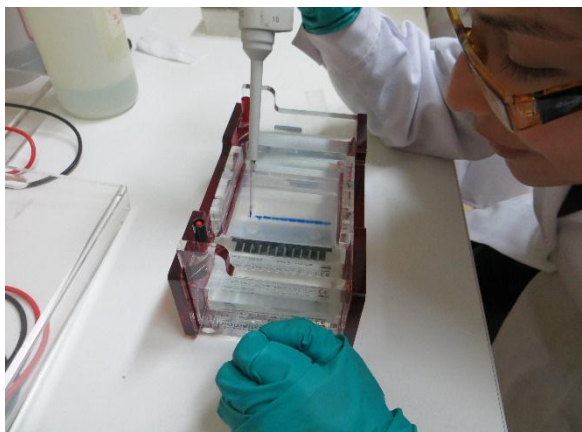
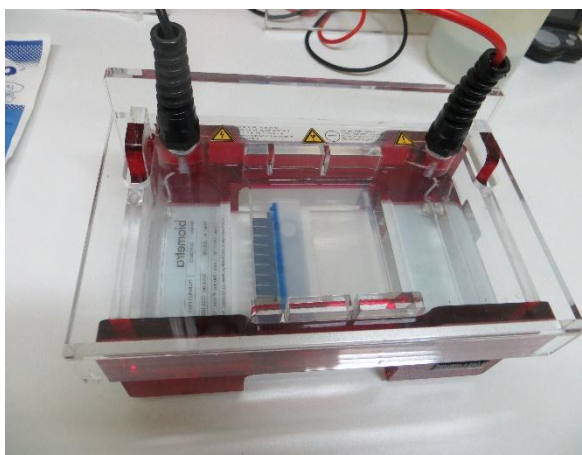


Imagen captado en el equipo transiluminador UV. Después de la fase de electroforesis para observar la integridad del ADN genómico extraído

Anexo 8. Fase de electroforesis para la detección de Genotoxicidad Ayacucho 2017.



Proceso de embrado en los pocillos del gel de agarosa de la solución de la digestión.



Cámara de electroforesis cargada con las soluciones de digestión.



Instalación y programación de la cámara de electroforesis a 50 v por 3 horas

Anexo 9. Fase de radiación UV para la visualización en gel de agarosa. Ayacucho. 2017.

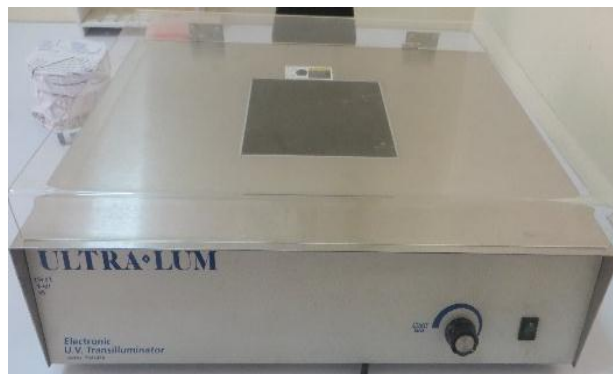


Adicionar la solución de bromuro de etidio 1% al recipiente hasta cubrir el gel de agarosa y dejar reposar por 15 minutos



Pasado los 15 minutos se devuelve la solución de bromuro de etidio 1% al frasco, luego se realiza el lavado del gel de agarosa con agua corriendo 2 veces con mucho cuidado

Anexo 10. Fase de lectura por radiación UV .Ayacucho 2017



Equipo transiluminador UV marca Ultra Lum

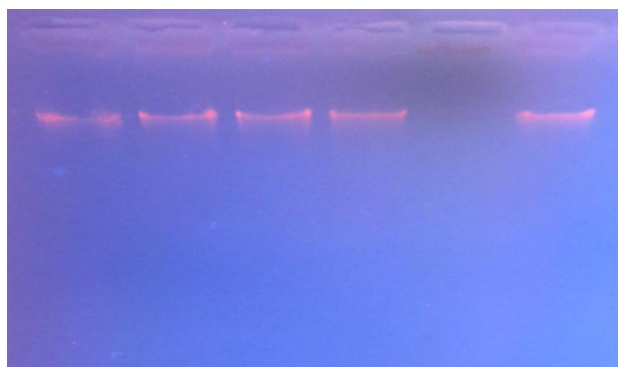


Imagen captada con cámara digital sobre el Equipo transiluminador UV



Cámara oscura del equipo registrador de imágenes Biometra UVsolo TS

Anexo 11. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “seda”, según la concentración del látex, frente a ADN genómicos humano y de *Leishmania spp*, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2017.

Condiciones de la incubación		Valor numérico del grado de genotoxicidad							
		ADN genómico humano (1500 ng/μL).				ADN genómico de <i>Leishmania spp</i> (1500 ng/μL).			
Temperatura °C	Tiempo Hora	Concentración del látex de “plátano” (%).				Concentración del látex de “plátano” (%).			
		5	10	50	100	5	10	50	100
37	1	1	4	4	4	1	4	4	4
		0	4	4	4	1	4	4	4
		0	4	4	4	1	4	4	4
		1	4	4	4	1	4	4	4

Anexo 12. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad “isla”, según la concentración del látex, frente a ADN genómicos humano y de *Leishmania* ssp, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2017.

Condiciones de la incubación		Valor numérico del grado de genotoxicidad							
		ADN genómico humano (1500 ng/μL).				ADN genómico de <i>Leishmania</i> ssp (1500 ng/μL).			
Temperatura °C	Tiempo Hora	Concentración del látex de “plátano” (%).				Concentración del látex de “plátano” (%).			
		5	10	50	100	5	10	50	100
37	1	1	1	4	4	1	2	4	4
		1	2	4	4	1	2	4	4
		1	2	4	4	1	2	4	4
		1	1	4	4	1	1	4	4

Anexo 13. Resultados de la Prueba Kruskal Wallis del efecto genotóxico del látex de *Musa paradisiaca* L. plátano variedad seda e isla frente al ADN genómico de humano y leishmania spp. respectivamente a 1 hora de incubación a 37^ac variedad isla. Ayacucho. 2017.

Muestra	Prueba Kruskal Wallis	Resultado
Seda - Humano	H	8,47
	gl	3
	p	0,037
Seda - Leishmania	H	8,47
	gl	3
	p	0,037
Isla - Humano	H	11,65
	gl	3
	p	0,009
Isla - Leishmania	H	12,09
	gl	3
	p	0,007

Anexo 14. Evaluación de la diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad seda frente al ADN genómico Humano mediante la prueba de Von Ferroni. Ayacucho 2017.

Concentraciones del Látex			Resultados	
5 - 10	-8	0	***	-9.287077 -6.712923
5 - 50	-8	0	***	-9.287077 -6.712923
5 - 100	-8	0	***	-9.287077 -6.712923
10 - 50	0	1		-1.287077 1.287077
10 - 100	0	1		-1.287077 1.287077
50 - 100	0	1		-1.287077 1.287077

Anexo 15. Evaluación de la diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad seda frente al ADN genómico *Leishmania* spp. mediante la prueba de Von Ferroni. Ayacucho 2017.

Concentraciones del Látex					Resultados	
5	-	10	-8	0 ***	-9.287077	-6.712923
5	-	50	-8	0 ***	-9.287077	-6.712923
5	-	100	-8	0 ***	-9.287077	-6.712923
10	-	50	0	1	-1.287077	1.287077
10	-	100	0	1	-1.287077	1.287077
50	-	100	0	1	-1.287077	1.287077

Anexo 16. Evaluación de la diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del látex de *Musa paradisiaca* L. "plátano" variedad isla frente al ADN genómico Humano mediante la prueba de Von Ferroni. Ayacucho 2017.

Concentraciones del Látex					Resultados	
5	-	10	-2	0.1837		-4.574154 0.5741535
5	-	50	-9	0.0000	***	-11.574154 -6.4258465
5	-	100	-9	0.0000	***	-11.574154 -6.4258465
10	-	50	-7	0.0000	***	-9.574154 -4.4258465
10	-	100	-7	0.0000	***	-9.574154 -4.4258465
50	-	100	0	1.0000		-2.574154 2.5741535

Anexo 17. Evaluación de la diferencia significativa entre las diferentes concentraciones del látex de *Musa paradisiaca* L. “plátano” variedad isla frente al ADN genómico *Leishmania* spp. mediante la prueba de Von Ferroni. Ayacucho 2017.

Concentraciones del Látex			Resultados				
5	-	10	-2.625	0.0189	*	-4.864297	-0.3857032
5	-	50	-9.000	0.0000	***	-11.239297	-6.7607032
5	-	100	-9.000	0.0000	***	-11.239297	-6.7607032
10	-	50	-6.375	0.0000	***	-8.448186	-4.3018141
10	-	100	-6.375	0.0000	***	-8.448186	-4.3018141
50	-	100	0.000	1.0000		-2.073186	2.0731859

Anexo 18. Matriz de consistencia

TÍTULO: Evaluación de la Genotoxicidad in vitro del látex de dos variedades de *Musa paradisiaca* L. “plátano” frente a ADN humano y de *Leishmania* spp. Ayacucho. 2017

PERSONAL INVESTIGADOR: Bach Tania Mendoza Almeida

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>Evaluación de la genotoxicidad in vitro del látex de dos variedades de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” frente a ADN humano y de <i>Leishmania</i> spp. Ayacucho. 2017</p>	<p>¿Tendrá efecto genotóxico in vitro el látex de dos variedades de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano”, frente a ADN humano y de <i>Leishmania</i> spp.?</p>	<p>Objetivo General Determinar la genotoxicidad in vitro del látex de dos variedades de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” frente a ADN humano y de <i>Leishmania</i> spp.</p> <p>Objetivos específicos Identificar los metabolitos secundarios presentes en el del látex de <i>Musa paradisiaca</i> “plátano” de las dos variedades (seda e isla). Realizar el ensayo de Genotoxicidad del látex de <i>Musa paradisiaca</i> “plátano” de las dos variedades (seda e isla). Evaluar la genotoxicidad in vitro del látex de <i>Musa paradisiaca</i> “plátano” de las dos variedades (seda e isla) a través de la fragmentación del ADN genómico humano y de <i>Leishmania</i> spp.</p>	<p>Aspectos botánicos de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano”. Clasificación taxonómica Descripción morfológica Distribución geográfica Diversidad genética Composición química Compuestos fenólicos y polifenólicos Genotoxicidad</p>	<p>El látex de dos variedades de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano”, presenta efecto genotóxico en un ensayo preliminar in vitro frente a ADN genómico humano y de <i>Leishmania</i> spp.</p>	<p>Variable independiente Diversas concentraciones del látex de dos variedades de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano”</p> <p>Indicadores</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5 mg/mL • 10 mg/mL • 50 mg/mL • 100mg/mL <p>Variable dependiente Efecto genotóxico del látex de dos variedades de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano”</p> <p>Indicadores Clase 0: Fragmentación de DNA < 5% Clase 1: Fragmentación de DNA entre 5 a 20% Clase 2: Fragmentación de DNA entre 20 a 40% Clase 3: Fragmentación de DNA entre 40 a 95% Clase 4: Fragmentación de DNA > 95%</p>	<p>I. Tipo de investigación: Básica descriptiva analítica transversal.</p> <p>II. Muestreo Población: Frutos de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” del distrito de Ayna, La Mar- Ayacucho Muestra: 5.00 Kg de frutos de <i>Musa Paradisiaca</i> “plátano” de dos variedades: seda e isla.</p> <p>III. Diseño metodológico Las muestras de <i>Musa paradisiaca</i> L. “plátano” fueron recolectadas en la comunidad de Arizona, en el distrito de Ayna, provincia de La Mar, departamento de Ayacucho a 941.42 nsnm.</p> <p>Diseño Experimental: Se preparará un tubo con ADN stock a 1500ug/mL Se procede a rotular 6 tubos. A los tubos 1, 2, 3, 4 y 6 se adicionará 14 uL de ADN de la solución stock, se adicionará 6uL de solución de látex de 5, 10, 50 y 100 mg/mL a los tubos 1,2,3,4 respectivamente, al tubo 5 se adicionará el mismo volumen de la solución de 100mg/mL. al tubo 6, se adicionará 6 uL de agua bidestilada estéril. Todos los tubos tienen un volumen total de 20 uL. Incubar en baño maría a 37°C por una hora. El revelado UV luego de una corrida electroforética y fijación con bromuro de etidio permite reportar los resultados en función del fraccionamiento del DNA genómico.</p> <p>IV. Análisis de datos Prueba de Kruskal-Walis p 95%</p>