

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE
FARMACIA Y BIOQUÍMICA**



**Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas
medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L.
"leche leche" y *Ficus carica* L. "higo". Ayacucho,
2013.**

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

PRESENTADO POR:

Bach.PILLACA UNTIVEROS, LIZBETH

AYACUCHO – PERÚ

2014

ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS
Bach. Lizbeth PILLACA UNTIVEROS
RD.Nº 075 – 2014 – FCB – D

En la ciudad de Ayacucho siendo las 4:05 pm del día ocho de agosto del dos mil catorce, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, se reunieron los miembros del jurado calificador presidido por el Dr. Homero Ango Aguilar, en calidad de presidente encargado con Memorando Nº 313-2014-UNSCH-FCB, y como miembros el Mg. Saturnino Martin Tenorio Bautista, el Dr. Edwin C. Enciso Roca, quien además actúa como secretario docente (e) y el Blgo. Tomas Y. Miranda Tomasevich como asesor, con la finalidad de recepcionar el acta de sustentación de la tesis titulada "Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo". Ayacucho, 2013, presentada por la bachiller en Farmacia y Bioquímica Lizbeth Pillaca Untiveros, quien pretende obtener el título profesional de Químico Farmacéutica.

Constatada la documentación, el Dr. Homero Ango Aguilar dio la autorización para que la sustentante lo haga en el tiempo reglamentario no superior a 45 minutos, lo cual es realizado por la sustentante.

Concluido con la sustentación, el presidente (e) invita a los miembros del jurado para que puedan realizar sus preguntas y así como solicitar las aclaraciones necesarias; dando respuesta a ello la sustentante.

Concluida con esta parte se invita a la sustentante como al público asistente para que abandonen el auditorio con la finalidad de efectuar la calificación por parte de los miembros del jurado evaluador en privado, obteniéndose los siguientes resultados:

Jurado evaluador	Exposición	Rta a Preguntas	Promedio
Mg. Saturnino Martin Tenorio Bautista	18	18	18
Dr. Edwin C. Enciso Roca	17	17	17
Blgo. Tomas Y. Miranda Tomasevich	19	19	19
Dr. Homero Ango Aguilar	16	16	16
		PROMEDIO	18


De la calificación realizada se obtuvo la nota promedio de Dieciocho (18).

A continuación se invita a la sustentante y al público a ingresar al auditorio, con la finalidad de que se le dé a conocer los resultados y se le tome la juramentación respectiva.

El acto de sustentación culminó siendo las 6:40 pm. Firmando al pie de la presente los miembros del jurado calificador como constancia del acto.



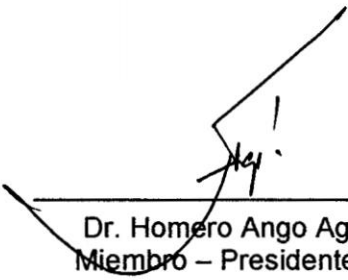
Mg. Saturnino Martin Tenorio Bautista
Miembro



Dr. Edwin C. Enciso Roca
Miembro – Secretario (e)



Blgo. Tomás Y. Miranda Tomasevich
Asesor



Dr. Homero Ango Aguilar
Miembro – Presidente (e)

DEDICATORIA:

Este trabajo se lo dedico a mis padres, hermanos y amigos que siempre han estado junto a mí para apoyarme en todos los proyectos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi *Alma Mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por permitirme realizar y culminar mi carrera; y a los docentes por su constancia en el desarrollo profesional de sus alumnos.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, y en merito especial a la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica y a los docentes de nuestra gloriosa y prestigiosa casa superior por haberme contribuido en el conocimiento y orientación de mi formación académica.

A mis asesores Blgo. Tomás Yuret MIRANDA TOMASEVICH y Mg. Enrique Javier AGUILAR FELICES, por dedicarme el tiempo y disponibilidad necesaria para la elaboración del proyecto durante la ejecución y culminación.

A todas las personas quienes estuvieron al lado, aconsejándome y brindándome todo su apoyo incondicional durante el proceso de la investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Aspectos botánicos de la <i>Euphorbia peplus</i> L. “leche leche”.	7
2.3. Aspectos botánicos de la <i>Ficus carica</i> L. “higo”.	9
2.4. Verruga de la piel.	14
2.5. Modelo Tridimensional del ADN	15
2.6. Evaluación genotóxica	17
2.7. Cuantificación y determinación de pureza de ADN.	19
2.8. Electroforesis en gel	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	22
3.2. Población y muestra	22
3.3. Material biológico	22
3.4. Diseño metodológico para la recolección de datos	23
3.4.1. Recolección de la muestra	23
3.4.2. Obtención del látex	23
3.4.3. Tamizaje fitoquímico del látex de la <i>Euphorbia peplus</i> L. “leche leche” y <i>Ficus carica</i> L. “higo”.	23
3.5. Extracción de ADN genómico de linfocitos humano	24
3.6. Cuantificación de ADN genómico de linfocitos humano	26
3.6.1. Espectrofotometría	26
3.6.2. Electroforesis	26
3.7. Ensayos de genotoxicidad <i>in vitro</i>	27
3.8. Análisis de datos	30

IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSIÓN	46
VI. CONCLUSIONES	54
VII. RECOMENDACIONES	55
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS	59

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Preparación de diluciones de ADN a diferentes concentraciones para patrones de banda en electroforesis	27
Tabla 2. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad “ <i>in vitro</i> ” de ADN genómico, por efecto de extractos de plantas medicinales.	28
Tabla 3. Valoración numérica de la genotoxicidad, según fragmentación.	30
Tabla 4. Metabolitos secundarios presentes en el látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. “leche leche”.	32
Tabla 5. Metabolitos secundarios presentes en el látex de <i>Ficus carica</i> L. “higo”	33
Tabla 6. Cuantificación mediante espectrofotometría ultra violeta de ADN genómico extraído de linfocitos humano.	34
Tabla 7. Características del ensayo fitoquímico de metabolitos secundarios	63
Tabla 8. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio	68
Tabla 9. Prueba de Mann-Whitney del tiempo de incubación de <i>Euphorbia peplus</i> L. “leche leche”.	69
Tabla 10. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración de <i>Euphorbia peplus</i> L. “leche leche”.	70
Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración en dos tiempos de incubación de <i>Euphorbia peplus</i> L. “leche leche”.	71
Tabla 12. Prueba de Mann-Whitney del tiempo de incubación de <i>Ficus carica</i> L. “higo”.	72
Tabla 13. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración de <i>Ficus carica</i> L. “higo”	73
Tabla 14. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración en dos tiempos de incubación de <i>Ficus carica</i> L. “higo”.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Electroforesis de patrones de bandas de ADN genómico extraído de ADN de linfocitos humano a diferentes concentraciones, en gel de agarosa al 1%.	35
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano a 700 ng/μL, con látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a concentraciones de 100%, 25% y 50% a 37°C durante 1 hora respectivamente.	36
Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, con látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%, durante 1 y 4 horas de incubación a 37°C.	37
Figura 4. Reproducibilidad del efecto genotóxico del ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/μL, con látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% a 37°C durante 1 y 4 horas de incubación a 37°C; y marcador de tamaño molecular de 100pb, en electroforesis con gel de agarosa al 1%.	38
Figura 5. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a diferentes concentraciones, durante 1 hora de incubación a 37°C.	39
Figura 6. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" a diferentes concentraciones, durante 4 horas de incubación a 37°C	40
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano a 1000 ng/μL, con látex de <i>Ficus carica</i> L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% incubados durante 1 y 4 horas a 37°C.	41
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la	42

genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/ μ L, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% durante 1 y 4 horas a 37°C.

- Figura 9. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones, durante 1 hora de incubación a 37°C. 43
- Figura 10. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones, durante 4 horas de incubación a 37°C. 44
- Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad de ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/ μ L, como prueba control con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%. 45

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche"	60
Anexo 2. Certificado de identificación taxonómica <i>Ficus carica</i> L. "higo".	61
Anexo 3. Flujoograma de la actividad genotóxica "in vitro".	62
Anexo 4. Características del ensayo fitoquímico de metabolitos secundarios	63
Anexo 5. Fotografía de la recolección de la <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo".	64
Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN genómico de linfocitos humano.	65
Anexo 7. Protocolo para la determinación del efecto genotóxico in vitro mediante electroforesis, propuesto por Miranda T.	66
Anexo 8. Ladeer (Marcador de tamaño molecular de 100pb)	67
Anexo 9. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio.	68
Anexo 10. Prueba de Mann-Whitney del tiempo de incubación de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche".	69
Anexo 11. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche".	70
Anexo 12. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración en dos tiempos de incubación de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche".	71
Anexo 13. Prueba de Mann-Whitney del tiempo de incubación de <i>Ficus carica</i> L. "higo".	72
Anexo 14. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración de <i>Ficus carica</i> L. "higo".	73
Anexo 15. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración en dos tiempos de incubación de <i>Ficus carica</i> L. "higo".	74
Anexo 16. Matriz de consistencia	75

RESUMEN

Tradicionalmente algunas de las infecciones virales, principalmente las que afectan a nivel de la piel, como las verrugas, han sido tratados con productos de origen vegetal; y los estudios de genotoxicidad se orientan a evidenciar a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por los compuestos evaluados. Motivo por el que realizamos el presente estudio teniendo como objetivo determinar el efecto genotóxico "in vitro" del látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo". Esta investigación descriptiva, se desarrolló en los Laboratorios de Farmacognosia de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, y el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre del 2013 y marzo del 2014 en la ciudad de Ayacucho. El látex fue obtenido directamente de la planta, realizando un corte del tallo de la "leche leche" y base del fruto verde del "higo" (sicono), se realizó el tamizaje fitoquímico, y la determinación genotóxica del látex a diferentes concentraciones, expuestos sobre el ADN genómico de linfocito humano, mediante el "método Tomasevich", cuya estimación del daño genotóxico "in vitro" fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS y cámara digital convencional. Los metabolitos secundarios identificados en látex "leche leche" fueron: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, flavonoides, saponinas y principios amargos y astringentes, y en látex de "higo" alcaloides, lactonas y/o cumarinas, flavonoides y principios amargos y astringentes. El látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" como de *Ficus carica* L. "higo" presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico de linfocito humano, siendo a concentraciones de 100% y 50% la mayor fragmentación del ADN con respecto a 25% y 10%. Se concluye que el látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" presentan efecto genotóxico "in vitro", que depende directamente de la concentración del látex; mas no así del tiempo de incubación.

Palabras clave: Genotoxicidad, ADN genómico de linfocitos humano, *Euphorbia peplus* L. y *Ficus carica* L.

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas que la humanidad ha enfrentado durante su existencia viene a ser las infecciones virales, tradicionalmente algunas de estas infecciones principalmente las que afectan a nivel de la piel como las verrugas, han sido tratados con productos de origen vegetal, que al mismo tiempo podrían proporcionar una alternativa de solución frente a este problema.

El uso de las plantas medicinales en la terapéutica requiere, al igual que los productos sintéticos, de investigaciones previas y posteriores a su comercialización, donde sigan siendo observadas mediante estudios de farmacovigilancia.¹

Las pruebas de toxicidad se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano ya que, se han detectado que la *Euphorbia peplus* L. es uno de una serie de plantas de la familia *Euphorbiaceae* que ha atraído la atención como un remedio casero para el cáncer de piel debido a su savia lechosa. Sin embargo, una encuesta realizada por Peplin Biotech de más de 200 especies de la familia *Euphorbiaceae* ha demostrado que sólo *Euphorbia peplus* L. tiene los atributos deseados de eficacia anticancerígena *in vitro* e *in vivo*.²

Mientras tanto el látex del "higo" tiene un efecto irritante sobre la piel, debido a su contenido en furocumarinas, por lo que se utiliza para ablandar y estimular los callos, durezas y verrugas.³

Los compuestos genotóxicos producen efectos que pueden manifestarse en el propio individuo o en su descendencia originando enfermedades genéticas. Tales razones justifican que las investigaciones de genotoxicidad sean tan necesarias y en este sentido se amplíen los conocimientos de las plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" respecto a los posibles efectos sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN).³ En los últimos años estas pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.²⁹ Al látex de estas plantas se le atribuye propiedades antimicótica, anticancerígena, purgante en pocas gotas, como bactericida, para extirpar verrugas, como cicatrizante de heridas, como antiséptico, etc, las mismas que fueron demostradas por trabajos de investigación. Se emplea un sistema de ensayo a corto plazo *in vitro* utilizando el ADN genómico de linfocito humano como organismo para detectar daño genético.

Como parte del estudio farmacológico y toxicológico de estas plantas, en el presente trabajo se pretende desarrollar los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Determinar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo".

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios en el látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo".
- Caracterizar el efecto de la genotoxicidad del látex de las plantas medicinales antiverrucosas en estudio, con ensayos *in vitro* sobre el ADN genómico de linfocitos humano, detectado mediante electroforesis.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Las plantas medicinales son utilizadas por billones de personas en la mayor parte de los países en vías de desarrollo, debido a la falta de asistencia de los servicios de salud, su bajo costo y efectividad, así como las creencias y preferencias culturales.⁴

Rueda, 2012.,⁵ señala que una de las propiedades atribuidas y exitosamente comprobadas clínicamente, en especies de plantas con látex, es su actividad antitumoral y citotóxica.

Vega, 2006.,⁶ evaluó el efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo” en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. “cebolla”; determinando mediante el método de la variación del índice mitótico con lectura entre 1000 a 3500 células por muestra, que según la prueba de Tukey la especie que tiene mayor efecto citostático fue la *Euphorbia peplus* L. (IM=0,00%), seguido de *Ficus carica* L. (IM=0,32%). El tiempo de tratamiento de mayor actividad antimitótica fue a las 8 horas con látex al 3% de *Euphorbia peplus* L. “leche leche”, seguido del látex al 10% de “higo” a las 24 horas.

El tratamiento tradicional de las verrugas de la piel, también ha hecho uso de otros productos naturales como lo realizado por Ayala y Miranda, 1992.,⁷ con hemolinfa de *Epicauta sp* previa remoción de la corteza de la verruga con agujas

hipodérmicas estériles (sin necesidad de sangrar) que al cabo de 24 a 36 horas, las formaciones verrucosas con menos de 5 mm de diámetro, fueron completamente disueltas o digeridas, lavaron con agua y jabón observando normal cicatrización a los 8 días.

Yoc *et al*, 2012,⁸ evaluaron la actividad biocida, citotóxica y genotóxica de extractos de tres plantas medicinales de la familia *Euphorbiaceae*. El único extracto que presentó actividad inhibitoria *in vitro* significativo contra bacterias y hongos fue *Euphorbia lancifolia* con una CIM de 1 mg/mL contra *Bacillus subtilis* y *Trichophyton mentagrophytes* ($p=0,0312$). Para la determinación de citotoxicidad y genotoxicidad se utilizó el bioensayo de *Allium cepa* L. con extracto de *Cnidoscolus aconitifolius* var. *mansa*, *Cnidoscolus aconitifolius* var. *estrella* presentaron actividad citotóxica y genotóxica significativa a concentraciones menores de 1 mg/mL ($p<0,0001$).

Siller *et al*, 2010,⁹ realizaron un estudio randomizado en fase IIa con PEEP005 (mebutato de ingenol, es un nuevo agente extraído de la planta *Euphorbia peplus* L., conocida por sus efectos terapéuticos en carcinoma basocelular, queratosis actínicas y verrugas); en gel se utiliza para el tratamiento tópico de carcinoma basocelular superficial, así se realizó un estudio 60 pacientes con diagnóstico clínico e histológico de carcinoma basocelular, con lesiones de 4-15 mm de diámetro y un grosor de hasta 4 mm. Las lesiones fueron extirpadas el día 85 de tratamiento para realizar el examen histológico y tinción con HE en 10 a 50 secciones por lesión.

Llanes, 2009,¹⁰ evaluó diferentes aspectos de la actividad inmunomoduladora de 24 extractos de 10 plantas de la familia *Euphorbiaceae* sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de individuos sanos. Demostrando que los veinticuatro extractos evaluados en este estudio presentó actividad inmunomoduladora directa sobre CMSP y quince de ellos tenían la capacidad de

modular la actividad biológica de la PHA, CHX o LPS sobre CMSP. Al menos uno de los extractos de cada planta tienen actividad directa sobre las CMSP o modulan la actividad biológica de los compuestos utilizados.

Craig, 2002,² señala que el tratamiento tópico de cáncer de piel no melanoma; los carcinomas de células basales (BCC) y los carcinomas de células escamosas (SCC) son los cánceres humanos más comunes; planteando que como primera aplicación médica está la *Euphorbia peplus* L. producto, es uno de una serie de plantas de la familia *Euphorbiaceae* que ha atraído la atención como un remedio casero para el cáncer de piel debido a su savia lechosa. Sin embargo, una encuesta realizada por Peplin Biotech de más de 200 especies de la familia *Euphorbiaceae* ha demostrado que sólo *Euphorbia peplus* L. tiene los atributos deseados de eficacia anticancerígena *in vitro* e *in vivo*.

Chacua, 2010,³ señala que el látex de los higos y de las hojas tiene un efecto irritante sobre la piel, debido a su contenido en furocumarinas, por lo que se utiliza para ablandar y estimular los callos, durezas y verrugas.

Itzic, 2006,¹¹ señala que la utilización de la planta del higo, es un alimento altamente energético, laxante, demulcente y balsámico. La ficina le confiere propiedades antiinflamatorias y digestivas; también se utiliza para el tratamiento de las afecciones respiratorias: resfriados, gripe, faringitis, bronquitis, enfisema, asma; y otros como para la irritación gastrointestinal, inflamaciones locales: estomatitis, gingivitis, abscesos, forúnculos, quemaduras. El látex se emplea popularmente como anti verrugoso.

Gaig *et al*, 2000,¹² prepararon extractos de hojas y de tallos de *Ficus benjamina* que se utilizaron para las pruebas cutáneas con alergia, IgE específica (enzimoinmunoanálisis) mediante Pharmacia CAP System y SDS-PAGE *immunoblotting* para mostrar la presencia de proteínas fijadoras con masas moleculares entre 8 y 42 kDa. Dando como resultado ciento un pacientes (29 %)

referían exposición a *Ficus benjamina* o a otras especies de *Ficus*. Veintidós pacientes (6,3 %) estaban sensibilizados a *Ficus benjamina*. La Ig E específica fue positiva en 4 de 10 pacientes (enzimoinmunoanálisis) y en 2 de 19 (CAP-System). De los 22 pacientes sensibles a *Ficus benjamina*, ocho estaban sensibilizados a higo (tres con síntomas asociados), siete a kiwi (tres con síntomas) y dos a látex (uno con síntomas).

Silvers, 2012,¹³ evaluó el estudio clínico de la actividad antifúngica del gel con tocte, higo, dulcamara y salvia al aplicar en los rostros de los niños con *Malassezia furfur* (hongo), comprobándose que en la aplicación del control positivo con neo-nystasolona (crema antimicótica), con aplicación cada 24 horas reduce en un (95,15%) de igual forma con el gel da 96,87% de efecto sobre *Malassezia furfur* a los 15 días de tratamiento.

Carballo et al, 2005,¹⁴ realizaron un estudio a nivel genotóxico de las plantas medicinales: *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Lithraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam.) (Asteraceae); *Solanum sysimbriifolium* Lam. (Solanaceae), mediante el ensayo de electroforesis de una sola célula, determinando que cuatro de ellas, *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua), *Solanum sysimbriifolium* (espino colorado) y *Lithraea molleoides* (Molle de beber), indujeron daño al ADN, induciendo roturas de cadena simple y doble.

Reyes, 2007,¹⁵ demostró que el ácido maslínico posee un potente y selectivo efecto anticancerígeno, apoptótico y diferenciador sobre células de carcinoma de colon, utilizando dos líneas celulares de cáncer de colon, HT29 y Caco-2, que difieren en la expresión de ciertos oncogenes y dos líneas celulares normales de intestino, IEC-6 e IEC-18. Este efecto cancerígeno se produce, fundamentalmente, a través de los eventos moleculares como es de citotoxicidad

y genotoxicidad, esta última mediante un estudio de electroforesis en gel de agarosa del ADN.

2.2 Aspectos botánicos de la *Euphorbia peplus* L. “leche leche”.

2.2.1 Clasificación taxonómica de *Euphorbia peplus* L. “leche leche”.

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Rosidae
Orden	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Género	:	Euphorbia
Especie	:	<i>Euphorbia peplus</i> L.
Nombre Vulgar	:	“leche leche”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2013) (Anexo 1)

2.2.2 Descripción botánica

- Planta anual
- Longitud: crece hasta 30 cm
- Tallo varía de rojo a verde en la base cerca de la cima.
- Ramas: ramas desarrolla a medida que madura.
- Hojas: longitud (1-3 cm), forma (oval aguda), patrón (alternan a lo largo del tallo, pero opuesta en la parte superior de la planta).
- Flores: amarillo-verde.
- Frutos y semillas: la fruta tiene tres lóbulos que contienen las semillas.
- Medio Ambiente: Las zonas templadas y subtropicales.
- Suelo: calcáreo arenoso.

- Ubicación: prefiere la sombra (jardines), bordes de caminos, tierras cultivadas, campos húmedos, acequias.¹⁶

2.2.3 Usos tradicionales

La parte utilizada de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" en medicina casera es el látex, con propiedad antimicótica, anticancerígena, purgante en pocas gotas, como bactericida, para extirpar verrugas, como cicatrizante de heridas, como antiséptico, etc. Al contacto con la piel puede producir dermatitis por contacto y por fotosensibilización (exposición prolongada al sol) después de haber estado en contacto con el jugo. Debe evitarse el contacto con los ojos que puede producir desde irritaciones oculares hasta ceguera. Afecta el aparato digestivo, a los riñones y al hígado, produciendo irritaciones considerables en personas que ingieren el látex, pudiendo causar la muerte si la cantidad ingerida es elevada.¹⁰

Las semillas y el polvo de las raíces se han utilizado como laxantes para tratamiento en casos de estreñimiento. El contacto de látex con la piel produce un enrojecimiento muy fuerte de la piel (rubefaciente) con fuerte aparición de ampollas, propiedades que eran aprovechadas para tratar externamente dolores reumáticos de todo tipo.¹⁸

La familia Euphorbiaceae como la *Euphorbia hirta* L. su látex lechoso se aplica tópicamente para el tratamiento de heridas y labios partidos. El tallo de *Euphorbia tirucalli* Thunb., se prepara en infusión para tratar enfermedades de la piel en niños. Las hojas frescas de *Phyllanthus amarus* Schumach., y *Phyllanthus emblica* L, se muelen y mezclan con leche de vaca o cabra, bebida utilizada para curar la ictericia y tos respectivamente. *Croton socotranus* Balf. f. y *Euphorbia socotrana* Balf. f. son utilizadas para el tratamiento de enfermedades y heridas de la piel¹⁰. *Croton reflexifolius* Kunth, *Euphorbia pulcherrima* Willd ex Klotzsch y *Jatropha gaumeri* Greenm, son utilizadas para el tratamiento de enfermedades dermatológicas y tumores en la piel.^{19, 20}

2.2.4 Composición química

Principios activos; alcaloides (euforbina), dihidroxicumarina, esterres diterpenos, ingenol 3-angelate angelate (PEP005).¹⁷

De la especie *Euphorbia peplus* L. se aislaron derivados de jatropano, ingenanos y pepluanos.²¹

2.3 Aspectos botánicos de la *Ficus carica* L. “higo”.

2.3.1 Clasificación taxonómica de *Ficus carica* L. “higo”.

Se ubica en la siguiente categoría taxonómica:

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Sub clase	:	Hamamelidae
Orden	:	Urticales
Familia	:	Moraceae
Género	:	Ficus
Especie	:	<i>Ficus carica</i> L.
Nombre Vulgar	:	“higuera”

Fuente: Certificado emitido por el *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas, UNSCH (2013) (Anexo 2)

2.3.2 Distribución y hábitat

Ficus, nombre antiguo de la higuera. Carica, probablemente alude a Caria antigua comarca de Asia occidental y región mediterránea donde este árbol se cultivaba con profusión. Planta que fue introducida en Perú. Es una planta muy antigua con varias menciones en el Evangelio (la higuera que se seco o el joven que se subió a una higuera para ver a Jesucristo). En los mitos de Roma, el higo juega un importante papel. Era sagrado para Baco y se empleaba en ceremonias religiosas.²²

Se encuentran fundamentalmente en las regiones tropicales o subtropicales de nuestro país. En general están muy aprovechadas en jardinería, especialmente en su época juvenil como plantas de maceta en interior. Plantados sobre el suelo, con el tiempo, la mayoría de ellos, si las condiciones son propicias, alcanzan un crecimiento natural convirtiéndose en verdaderos árboles con grandes sistemas radicales, por lo que sus prolongadas raíces pueden dañar las construcciones humanas.²²

2.3.3 Descripción botánica

Árbol de pequeño porte, caducifolio, de tronco corto, grueso, con la corteza de color gris. Ramificada desde la base con frecuencia en estado natural. Copa redondeada, amplia, muy densa y de muy buena sombra. Hojas de gran tamaño, alternas, de 10 a 20 cm de longitud, anchas y largamente pecioladas, con cinco lóbulos de 3 a 7 cm, con la base truncada o redondeada, de margen algo dentado. Limbo áspero al tacto, de color verde oscuro en el haz y más claro y tomentoso en el envés, con la nerviación destacada. Especie dioica, las flores, son muy pequeñas, se encuentran en el inferior de un receptáculo carnoso llamado sicono (higo) que vienen a ser los frutos, grandes y auxiliares, solitarios o en pares. De forma globosa y contienen semillas en forma de núcula, y el color puede variar de verde a púrpura verdusco. La pulpa es comestible y de agradable sabor.²³

2.3.4 Composición química

Los higos tienen abundantes azúcares, principalmente glucosa y fructosa, los minerales Fe, Mn, Ca (más por gr. que la leche), K (en gran cantidad) y Br, y las vitaminas A, B1, B2 y C. También cantidades variables de los ácidos cítrico, málico y acético, gran cantidad de fibra (más que cualquier otra fruta fresca o seca), materias gomosas y mucílago. Estos tres últimos componentes, junto con el agua, son los responsables principales de su acción laxante y pectoral.²²

Tallo: campesterol, hentriacontanol, estigmasterol, euphorbol y su exacosanate, ingenol y taraxerone.²²

Hojas: humedad 67,6%; proteína 4,3%; grasa 1,7%; fibra cruda 4,7%; cenizas 5,3%; extracto libre de nitrógeno 16,4%; pentosanas 3,6%; caroteno, bergaptene, estigmasterol, sitosterol, y la tirosina. Ficusin, taraxasterol, beta-sitosterol, rutina, sapogeninas, acetato Calotropenyl, lepeolacetate y oleanólico.²³

Látex: caucho (2,4%), resina, albúmina, Cerin, azúcar y ácido málico, renina, papaína, enzimas proteolíticas, diastasa (similar al jugo pancreático), esterasa, lipasa, catalasa, peroxidasa.²²

Semilla: las semillas secas contienen 30% de un aceite fijo que contiene los ácidos grasos: ácido oleico 18,99%; linoleico 33,72%; linolénico 32,95%; palmítico 5,23%; esteárico 2,18%; araquídico 1,05%. Es un aceite comestible y puede ser utilizado como un lubricante.²²

2.3.5 Propiedades fitoquímicas

Ficus carica L. tiene numerosos compuestos bioactivos, como mucílagos, flavonoides, vitaminas, enzimas, nicotínicos ácido y tirosina. Ficus, estigmasterol, psoraleno, taraxasterol, beta-sitosterol, rutina, sapogeninas, Acetato Calotropenyl, lepeolacetate y ácido oleanólico sistosterol están presentes en la hoja.²⁴

2.3.6 Propiedades fitofarmacológicas

Actividad hepatoprotectora: Reversión significativa de bioquímicos, histológicos y cambios funcionales inducidos por donde éter de petróleo extraer el tratamiento en ratas tratadas con rifampicina, lo que indica prometedora actividad hepatoprotectora.²⁴

Actividad hipoglucémica: El extracto de la hoja inducida por un hipoglucemiante significativa efecto de la administración oral o intraperitoneal en ratas diabéticas por estreptozotocina. La pérdida de peso fue impedido en las

ratas diabéticas tratadas y la supervivencia índice fue significativamente alterada por la insulina en plasma niveles. Los resultados muestran que *Ficus carica* L. extracto acuoso tiene una clara actividad hipoglicemiante.²⁴

Actividad contra el cáncer: Compuestos activos Bio como 6 - O-acil- β -D-glucosil- β -sitosterol, el moeity acilo ser principalmente palmitoil y linoleilo con cantidades menores de estearilo y oleilo, ha sido aislado como un potente agente citotóxico del látex de *Ficus carica* L. Tanto la natural y la sintética compuestos mostraron en efectos inhibitorios in vitro en la proliferación de diversas líneas celulares de cáncer.²⁴

Actividad antioxidante: Los potenciales electores que promueven la salud de los frutos fueron estudiados con seis variedades de higuera comerciales difieren en el color (negro, rojo, amarillo y verde) se analizaron los polifenoles totales, flavonoides totales, capacidad antioxidante, y el perfil de antocianinas. En la misión de color oscuro y el rojo Brown-Turquía variedades, la fracción antocianina aportaron 36 y 28% de la capacidad total de antioxidante, C3R (cianidina- 3 - O-rutinósido) aportaron el 92% del total la capacidad antioxidante de la fracción de antocianina. Frutas de la variedad misión contenía los niveles más altos de polifenoles, flavonoides y antocianinas y exhibido la capacidad antioxidante más alta.²⁴

Actividad antipirética: El extracto de etanol de *Ficus carica* L., a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg mostró significativa dependiente de la dosis reducción de la temperatura corporal normal y la levadura- provocado temperatura elevada. El efecto de extender hasta a cinco horas después de la administración del fármaco cuando se compara a la de paracetamol (150 mg / kg.), un estándar anti- agente antipirético. Esto demuestra el efecto anti pirético de extracto de etanol.²⁴

Actividad antibacteriana: El extracto de metanol de (PRM 0,156 a 5 mg / mL; MBC, 0,313 a 5 mg / mL) mostraron una fuerte actividad antibacteriana contra

las bacterias orales. Los efectos de combinación de extracto de metanol con ampicilina y gentamicina fueron sinérgica contra orales bacterias. Está comprobado que las figuras podrían actuar como naturales agente antibacteriano.²⁴

Actividad fungicida: Metanólico, hexanoico, acetato clorofórmico y acetato extractos de *Ficus carica* L. látex fueron investigados por sus propiedades antimicrobianas in vitro contra cinco especies bacterianas y siete cepas de hongos.²⁴

2.3.7 Usos y Aplicaciones

De gran eficacia contra todos los problemas relacionados con la respiración (dolores de garganta, problemas pulmonares y tos). Llevan gran cantidad de lignina, una fibra alimentaria que no se puede digerir, facilitando así problemas de estreñimiento. Son los higos una gran fuente de energía dado la cantidad de carbohidratos que presentan. La cantidad de calcio que tienen es sumamente interesante por ser muy similar a la de la leche siendo de este modo muy beneficiosos para las aftas bucales, gingivitis y abscesos. El hierro que presentan puede ayudar mucho en personas con anemia o trastornos en la asimilación de hierro. Son muy útiles ante una regla menstrual dolorosa; además es una fuente muy rica de benzoaldehído, un agente anticancerígeno. Contiene enzimas y flavonoides que ayudan en el proceso digestivo. El látex es tóxico puesto que tiene una acción irritante sobre la piel, por acción de la furanocumarinas. También el simple contacto con estas plantas puede producir fotosensibilidad, que se muestra en forma de ampollas, por lo que debemos ir con cuidado a la hora de manipular estas plantas y en ningún caso ingerir sus hojas o ramas.³

La parte utilizada del *Ficus Carica* L. es el látex, se usan para el tratamiento de las verrugas de piel, generando una desaparición y rápida cicatrización. Dadas

sus excelentes cantidades de hierro, puede utilizarse en ensalada como fuentes complementarias de este minerales; muy útiles en la preparación de repostería cortados en trozos pequeños como la mermelada.¹³

El látex que emanan de sus frutos y hojas puede usarse como analgésico contra picaduras de insectos y para la maceración de carne, aunque produce alergias en determinadas personas. De las hojas se puede obtener un tinte negro para el cabello.²⁴

2.4. Verruga de la piel.

Las verrugas son epitelomas infecciosos benignos que afectan a las capas superiores de la piel y las mucosas. El agente causal del virus de la verruga es un virus DNA cariotípico llamado *papiloma virus humano* (VPH).²⁵

Las verrugas son causadas por una infección viral de las células de la capa superficial de la piel o mucosa. Su diseminación a través de la piel es frecuente, si bien, a diferencia de las verrugas genitales, no se suelen contagiar fácilmente de un individuo a otro. Técnicas moleculares como la hibridación de ADN han permitido identificar unos 80 serotipos diferentes de VPH, algunos relacionados específicamente con grupos particulares de verrugas y otros con demostrado potencial oncogénico (VPH 16 y 18).²⁵

2.4.1 Transmisión de la verruga de la piel

Tras el contacto con personas que tengan verrugas, aunque el PVH tiene poca infectividad; no se conoce el periodo de incubación con exactitud y los datos recogidos apuntan a un periodo que va desde cuatro semanas a ocho meses. La autoinoculación directa determina la aparición y la posterior diseminación de nuevas verrugas. Esta necesita de un número alto de partículas virales, además de una rotura de la capa cornea, la más externa de la piel, para multiplicarse en la epidermis. El papilomavirus se puede transmitir de persona a persona.²⁵

2.4.2 Tratamiento de las verrugas de la piel

Las verrugas se consideran una enfermedad infecciosa autolimitada de origen vírico, por lo que su tratamiento no debe ser nunca demasiado agresivo evitando tratamientos que dejen cicatriz. El tratamiento de las verrugas dependerá del tipo de las mismas, de su número, tamaño y localización, de la experiencia del médico y del deseo del paciente. Se recomienda siempre un tratamiento conservador dada la tendencia a la resolución espontánea de las verrugas.²⁶

Si las verrugas no desaparecen solas pueden tratarse como primera opción se trata con Ácido salicílico, líquidos irritantes para estimular las defensas del organismo contra el virus y queratolíticos para disminuir el tamaño de estas. En caso de que estos no sean eficaces pueden emplearse método como la crioterapia, el bisturí eléctrico o el láser.²⁶

2.5 Modelo Tridimensional del ADN

En 1953, Watson y Crick postularon un modelo tridimensional para la estructura de ADN que estaba de acuerdo con todos los datos disponibles. Consiste en dos cadenas helicoidales de ADN enrolladas alrededor del mismo eje, que forman una doble hélice dextrógira. Los esqueletos hidrofílicos formados por unidades alternas de desoxirribosas y grupos fosfato cargados negativamente se hallan en el exterior de la doble hélice, en contacto con el agua circundante. Las bases purínicas y pirimidínicas de ambas cadenas están apiladas en el interior de la doble hélice, con sus estructuras en anillo hidrofóbicas y prácticamente planas situadas a muy corta distancia las unas de las otras y en posición perpendicular con relación al eje longitudinal de la hélice.²⁷

La relación espacial entre las dos cadenas da lugar a la formación de un surco mayor y un surco menor en la doble hélice. La doble hélice o el dúplex de DNA

se mantiene por dos tipos de fuerzas: enlaces de hidrógeno entre pares de bases complementarias e interacciones por apilamiento de bases.²⁷

Las dos hebras tienen orientación antiparalela; o sea que sus direcciones 5' → 3' son opuestas. Las hebras mantienen un registro exacto debido al apareamiento regular de las hebras: A se aparea con T a través de dos enlaces de hidrógeno; G se aparea con C mediante tres enlaces de hidrógeno. Esta complementariedad de pares de bases es consecuencia del tamaño, la forma y la composición química de las bases. La presencia de miles de estos enlaces de hidrógeno en una molécula de DNA contribuye en gran parte a la estabilidad de la doble hélice. Las interacciones hidrófobas y de van der Waals entre los pares de bases adyacentes apilados también contribuyen a la estabilidad de la estructura del DNA.²⁸

En principio, dos hebras de polinucleótidos pueden formar una hélice que gira hacia la derecha o hacia la izquierda, dado que la geometría de la columna vertebral de azúcar-fosfato se mas compatible con el DNA natural, es una hélice que gira hacia la derecha. Los patrones de difracción por rayos X del DNA indican que las bases apiladas están separadas por un espacio regular de 0,34 nm, a lo largo del eje de la hélice. La hélice completa un giro cada 3,4 nm; en consecuencia, hay unos 10 pares por giro. Esto se denomina la forma B del DNA, la forma normal presente en la mayoría del DNA celular.²⁸

Las dos cadenas antiparalelas de polinucleótidos en el DNA en doble hélice no son idénticas ni en secuencia ni en composición de bases. En cambio, son complementarias entre ellas, la característica fundamental del modelo de las dos hebras de DNA. El proceso de copia de la estructura (replicación) podría proceder de una manera lógica a través de (1) separación de las dos hebras y (2) la síntesis de una hebra complementaria para cada una de ellas mediante las concatenadas de nucleótidos en la secuencia especificada por las reglas de

apareamiento de bases comentadas anteriormente. Cada hebra preexistente podría funcionar como un molde para dirigir la síntesis de la hebra complementaria.²⁷

2.6 Evaluación genotóxica

La genotoxicidad es el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos con el aparato hereditario de la célula, y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número o estructura de los cromosomas, que pueden incorporarse en generaciones celulares subsecuentes llamadas mutaciones. La determinación genotóxica ya sea en agua, aire, alimentos, contaminantes y compuestos naturales con fines terapéuticos, resultan una herramienta útil para la identificación de riesgos a la salud humana y poder desarrollar medidas de prevención y control ya que las mutaciones que alteran la expresión génica se consideran como un rasgo común de todos los cánceres, aunque muchas de ellas pueden ser ventajosas o neutras y no ocasionar manifestaciones patológicas.²⁹

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afecciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), a los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica.²²

Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica especial para su evaluación genotóxica, por lo que deben ser sometidas a las mismas regulaciones que rigen los fármacos en general. La evaluación genotóxica de extractos de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de mutaciones genéticas y cromosómicas.³⁰

En el mundo las guías o rutas críticas para los estudios genotóxicos persiguen como objetivo fundamental evidenciar qué tipo o a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por el compuesto evaluado. En concordancia con ello se reconocen cuatro niveles: mutación génica (nivel I), mutación cromosómica (nivel II), daño primario del ADN (nivel III), transformaciones celulares (nivel IV), entre otras alteraciones¹². Los ensayos pertenecientes a los dos primeros niveles son muy variados y ampliamente utilizados, en especial las pruebas *in vitro* que se caracterizan por tener una alta sensibilidad y precisión.²² En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.³¹

Si los resultados *in vitro* son negativos, debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*. Una vez evaluados los niveles génico y cromosómico, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan daño primario al ADN y de acuerdo con el resultado obtenido, se debe tomar la decisión de realizar ensayos que midan otras alteraciones y carcinogenicidad. En cualquiera de los ensayos y niveles de daño evaluados se deben emplear protocolos estandarizados (validados internacionalmente) que tomen en consideración las dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta para el fármaco.³⁰

Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en el campo de la investigación científica para detectar genotoxicidad inicial: Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas; micronúcleos, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa).³⁰

2.7 Cuantificación y determinación de pureza de ADN

La pureza del ADN es un factor muy importante para los subsecuentes análisis moleculares. Existen en general métodos diferentes para medir la cantidad de ácidos nucleicos en solución entre los cuales podemos mencionar al método de absorbancia y el de fluorescencia.³²

2.7.1. Espectrofotometría

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260 nm) permite el cálculo de la concentración de ácido nucleico de la muestra. Si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de cadena doble de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo simplemente su absorbancia, sin necesidad de realizar una curva patrón.³²

Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptófano), así las lecturas a esta longitud pueden mostrar si existen algún contaminante proteico. El cálculo de una relación entre las lecturas a 260 nm y 280 nm es una manera común para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de una preparación de ADN con proteínas de ácido nucleico, esta relación debe estar entre los valores de 1,8 y 2,0. Si la muestra es pura, el primer método comúnmente usado para la cuantificación es el de espectrofotometría.³²

2.8 Electroforesis en gel

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

Entre las macromoléculas, las más utilizadas son las proteínas seguidas de los ácidos nucleicos, ya que ambos tipos presentan una carga importante, algo que no presentan los lípidos, sin contar con que son insolubles. El método consiste en inmovilizar las muestras en estudio en un material gelatinoso (gel). El gel se somete a una corriente eléctrica durante un periodo de tiempo determinado. Cada muestra comenzara a migrar a través de los poros del gel con una velocidad diferencial, que dependerá de la carga eléctrica y del tamaño molecular. Cuando las separaciones se han completado se interrumpe el paso de corriente y las muestras separadas se tiñen para visualizarse. Cada muestra se encontrara a una distancia distinta respecto al origen.³²

Los ácidos nucleicos presentan carga y son solubles ya que tienen un grupo fosfato, parte que confiere la carga, y está presente de forma regular en la estructura. Los acidos nucleicos tienen la capacidad de migrar en un campo eléctrico y por tanto, son susceptibles de ser separados por electroforesis. El gel se encuentra sumergido en un electrolito tamponado con tris-Borato (no glicina), para garantizar que los acidos nucleicos estén cargados negativamente; por esto a la técnica se le denomina electroforesis de inmersión. Las moléculas migraran

hacia el polo positivo, de modo que viajaran en esa dirección por el gel, separándose por tamaño (número de nucleótidos), a la hora de cargar la muestra se colocan unos marcadores de frente (loading dye) que nos permita detener la electroforesis en el momento que lo creamos oportuno. Para visualizar las bandas, hay que teñir el gel o marcar radiactivamente las moléculas. El método más utilizado en geles de agarosa es el bromuro de etidio, el cual se comporta como un agente intercalante, de modo que además de disminuir la densidad de la molécula, tiene la capacidad de emitir luz cuando se le excita con luz ultravioleta. Hay que tener cuidado con este compuesto ya que es altamente cancerígeno. La electroforesis en gel es muy utilizada en la detección, control de pureza, caracterización, cuantificación (por comparación con controles) así como preparación y purificación (por extracción de bandas desde el gel) de moléculas y fragmentos de DNA y RNA. La electroforesis en gel tiene dos mecanismos de separación: la electroforesis, que separa por la relación carga/tamaño y el tamizado por el gel, que separa mayormente por tamaño. Los geles más comunes son agarosa y poliacrilamida.³²

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del trabajo de investigación

El tamizaje fitoquímico del presente trabajo de investigación, se desarrolló en el laboratorio de Farmacognosia del Área de Farmacia; 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, durante los meses de octubre del 2013 y marzo del 2014.

3.2 Definición de población y muestra

3.2.1 Población:

Plantas de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" ubicadas en el rango altitudinal de 2700 msnm, que crecen en los diferentes pisos ecológicos de los distritos de Ayacucho y San Juan Bautista, respectivamente, de la provincia de Huamanga de la región de Ayacucho, Perú.

3.2.2 Muestra:

- 500 µL de látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche".
- 500 µL de látex de *Ficus carica* L. "higo".

3.3 Material biológico

ADN de linfocito humano.

3.4 Diseño metodológico para la recolección de datos

3.4.1 Recolección de la muestra

Las muestras de la *Euphorbia peplus* L. “leche leche” fueron recolectadas en los jardines de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga del distrito de Ayacucho; y las muestras de la *Ficus carica* L. “higo” recolectados de la huerta de un domicilio del distrito de San Juan Bautista, provincia de Huamanga, de la región de Ayacucho. Todas ellas en buen estado de conservación, recogidas en las primeras horas del día, e inmediatamente fueron transportadas a los laboratorios para los ensayos respectivos.

Para la identificación taxonómica de cada planta medicinal en estudio, se emplearon muestras con hojas, tallos y flores en cuanto a la “leche leche”; mientras para el “higo” hojas, flores y frutos, que fueron realizadas en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas por la Blga. Laura Aucasime Medina. (Anexo 1 y 2)

3.4.2 Obtención del látex

El látex de “leche leche” se obtuvo realizando cortes en los tallos verdes, para dejar caer el látex en tubos eppendorf estériles de 2 mL; para el caso del “higo” se realizó un corte en la base del fruto verde (sicono), para dejar caer el látex en tubos eppendorf estériles de 2 mL.

3.4.3 Tamizaje fitoquímico del látex de la *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”.

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa a los látex obtenidos de las plantas medicinales en estudio, para determinar los diferentes metabolitos secundarios, que se fundamentan en los cambios estructurales ocasionados en los metabolitos presentes, como aparición o desaparición de una coloración, formación o dilución de un precipitado o desprendimiento de gas. Las reacciones

de identificación, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Lock de Ugaz³³ y Miranda M.³⁴ (Tabla 5 y 6).

3.5. Extracción de ADN genómico de linfocitos humanos:

A partir de ésta etapa, el estudio se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática; cuatro unidades de bolsa colectora de sangre "cuádruple" fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos, para el desecho, se consiguió en donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho "Miguel Ángel Mariscal Llerena", para la obtención del ADN de linfocitos con el siguiente protocolo descrito en Miranda.³⁵

1. Se transfirió 1 mL de sangre (paquete globular) a un tubo de centrifuga con tapa rosca y se adicionó 9 mL del tampón Tris- HCL 50 mM (pH 7,7) precalentado a 37°C.
2. Se homogenizó e incubó a 37°C por 30 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
3. Se descartó el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur, dejando 1 mL del centrifugado en la parte inferior del tubo.
4. Se repitió dos veces, los procedimientos 1 (esta vez con 5 mL de tampón Tris - HCl 50 mM (pH 7,7), 2 y 3 hasta tener un preparado claro.
5. Se adicionó a 1 mL de lo centrifugado, 9 mL de solución salina (NaCl al 0,85%) se homogenizó y centrifugó a 2500 rpm/ 10 minutos.
6. Se aspiró y descartó el sobrenadante dejando solo el sedimento, se resuspendió el paquete celular en 0,4 mL de la solución "high TE" (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 100 mM), luego se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
7. Se adicionó 0,4 mL de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM). Precaentada a 50°C.

8. Se agregó 7 μL de la solución de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubó por una noche a 53°C.
9. Luego se adicionó 750 μL de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24: 1) y homogenizó por inversión, delicadamente durante 10 minutos.
10. Se instaló el tubo en la microcentrífuga por 10 minutos a 14000 rpm para separar las fases, luego se aspiró la fase superior acuosa que contiene el DNA y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1,5 mL.
11. A la fase acuosa, se adicionó 750 μL de la solución de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y homogenizó por inversión durante 5 minutos. Nuevamente se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm, se aspiró la fase acuosa que contiene el DNA y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL.
12. Se adicionó la solución de acetato de sodio 3M, pH 5,2. en cantidad de 20 μL .
13. Se agregó 600 μL de alcohol isopropílico helado y dejó en reposo por 1 hora en hielo. Luego se centrifugó por 15 minutos a 14000 rpm.
14. Se eliminó cuidadosamente el sobrenadante y enjuagó el sedimento con 1 mL de etanol al 70%.
15. Se centrifugó nuevamente por 10 min a 14000 rpm. Eliminando el alcohol y dejando secar el sedimento a temperatura ambiente.
16. Se resuspendió el sedimento con 80 μL de la solución "low TE" (Tris HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM) y se guardó en la nevera.

3.6. Cuantificación de ADN genómico de linfocitos humano

3.6.1 Por espectrofotometría

Procedimiento:

1. Homogenizó las muestras de ADN con una micropipeta de 100 μL , manteniendo el tip dentro de la muestra, luego presionando y retrocediendo el pulsador lentamente de manera uniforme unas 20 veces.
2. Se preparó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf BioPhotometer plus, con la opción de cuantificación de ADN.
3. Para limpiar la superficie de muestra del adaptador se depositó 2 μL de agua PCR por un minuto y se absorbió el agua utilizando papel tissue.
4. Nuevamente se depositó 2 μL de agua PCR sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de 10 – Lp 0,2 mm y se presionó la opción BLANK para calibrar y obtener “cero de Absorbancia” (0,000 A°).
5. Se absorbió el agua utilizando papel tissue, luego se depositó 2 μL de la muestra de ADN, se colocó la tapa y presionó la opción SAMPLE para ver el resultado de la cuantificación y pureza de ADN en la pantalla del equipo; luego se absorbió la muestra con papel “tissue”.
6. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.
7. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 2 μL de agua PCR, se dejó por un minuto luego se secó con papel “tissue” y apagó el equipo.

3.6.2 Por electroforesis

A partir del ADN cuantificado por espectrofotometría, se realizó diluciones con los siguientes pasos:

1. Conociendo la concentración de ADN de una muestra, se realizó diluciones sucesivas al décimo con agua PCR, hasta obtener una concentración final de 15 ng/ μL , en un volumen final de 100 μL .

2. A partir de ésta dilución de la muestra de ADN, se procedió a preparar volúmenes de carga para electroforesis en gel de agarosa a 1%, según la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de diluciones de ADN a diferentes concentraciones para patrones de banda en electroforesis.

Nº de orden	ADN stock (15ng/ μ L)	Buffer Loading 6X	Volumen final de carga	Concentración final de ADN	Nº de carril en gel de agarosa
1	04 μ L	02 μ L	06 μ L	60 ng	Carril 1
2	08 μ L	02 μ L	10 μ L	120 ng	Carril 2
3	12 μ L	02 μ L	14 μ L	180 ng	Carril 3
4	16 μ L	02 μ L	18 μ L	240 ng	Carril 4

3. Se cargó todo el contenido de las mezclas a cada uno de los pocillos del gel de agarosa de 1%, en sus respectivos carriles.
4. Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dejó correr a 50 voltios por 2 horas.
5. Se coloreó el gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% por 10 minutos y dos enjuagues suaves con agua corriente, luego se visualizó por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS. 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 con diferentes concentraciones.

3.7 Ensayos de genotoxicidad *in vitro*:

Se desarrolló con el "Método Tomasevich" propuesto por Miranda³⁵, con las siguientes fases:

3.7.1 Fase I: Cuantificación y preparación de Stock de ADN genómico de linfocitos humano

El ADN genómico de linfocitos humano obtenido, fue cuantificado por espectrofotometría UV en Eppendorf Bio Photometer plus; luego se preparó un stock de ADN a concentración de 1 500 ng/μL en volumen final de 150 μL, para cada planta medicinal en estudio.

3.7.2 Fase II: Prueba de genotoxicidad “*in vitro*” de ADN genómico de linfocitos humano

Se preparó las soluciones del látex de cada planta medicinal, a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%, con agua bidestilada estéril.

Se acondicionó las soluciones de genotoxicidad “*in vitro*” de ADN genómico, de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 2. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad “*in vitro*” de ADN genómico, por efecto del látex de plantas medicinales.

CONDICIONES		SOLUCIONES PARA PRUEBA DE GENOTOXICIDAD “ <i>in vitro</i> ”								
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Stock de ADN (1 500 ng/μL) Volumen en μL		14	14	14	14	14	14	14	14	14
Látex	Concentración (%)	100	50	25	10	100	50	25	10	-
	Volumen (μL)	6	3	1,5	0,6	6	3	1,5	0,6	-
Agua bidestilada estéril		-	3	4,5	5,4	-	3	4,5	5,4	6
Volumen total (μL)		20	20	20	20	20	20	20	20	20
Incubación a 37°C (h)			1				4			-

Se realizaron 4 repeticiones de las pruebas de genotoxicidad "*in vitro*", de cada planta medicinal en estudio.

3.7.3 Fase III: Electroforesis para la detección de genotoxicidad.

Se preparó el gel de agarosa al 1% y se dispuso de una cámara de electroforesis Biometra.

Para el volumen de carga en gel de agarosa, de los productos de la reacción de genotoxicidad, se utilizó las siguientes cantidades: 1 μL de loading (colorante señalizador de migración de las bandas), 4 μL de la solución para la prueba de genotoxicidad "*in vitro*" y 2 μL de agua bidestilada estéril, volumen final 7 μL ; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.

Adicionalmente se preparó el ladder 100 pb (marcador de tamaño molecular de 100 pb) con: 1 μL de loading, 4 μL de ladder y 2 μL de agua bidestilada estéril, volumen final 7 μL ; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.

Se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se corrió a 30 voltios (V) por 5 horas.

3.7.4 Fase IV: Radiación UV para la visualización de genotoxicidad.

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergirá el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos aproximadamente, se enjuagó con abundante agua corriente dos veces y se hizo la lectura por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS, adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar los fragmentos del ADN producto de la digestión

3.7.5 Fase V: 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 Poma.³⁶

Tabla 3. Valoración numérica de la genotoxicidad, según fragmentación.

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%
5	fragmentación de ADN < 5%

Fuente: Larrea Poma M., 2007

3.8 Análisis de datos

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. Para evaluar el daño genotóxico mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizó la prueba de comparación de medias Mann Whitney para dos muestras independientes y Kruskal Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de $p \leq 0,05$, se consideró como el nivel estadísticamente significativo.

IV. RESULTADOS

Tabla 4: Metabolitos secundarios en el látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche".

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Mayer	+++	Precipitado blanco
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	+	Precipitado naranja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	++	Precipitado azul
Flavonoides	Shinoda	+++	Anaranjado rojizo
Saponinas	Espuma	++	Espuma
Principio amargo y astringente		+++	

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

Tabla 5: Metabolitos secundarios en el látex de *Ficus carica* L. "higo".

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Mayer	+++	Turbidez
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado naranja
Flavonoides	Shinoda	++	Marrón claro
Principio amargo y astringente		+++	

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

Tabla 6. Cuantificación mediante espectrofotometría ultra violeta de ADN genómico extraído de linfocito humano.

Muestra	Concentración ADN µg/mL	ADN	PROTEINAS	PUREZA DE ADN
		A 260	A 280	A260/A280
1	1389,9	0,556	0,264	2,10
2	2672,3	1,069	0,532	2,01
3	5306,4	2,123	1,353	1,57
4	2776,7	1,111	0,824	1,35
5	2620,7	1,048	0,596	1,76
6	1634,7	0,654	0,352	1,86

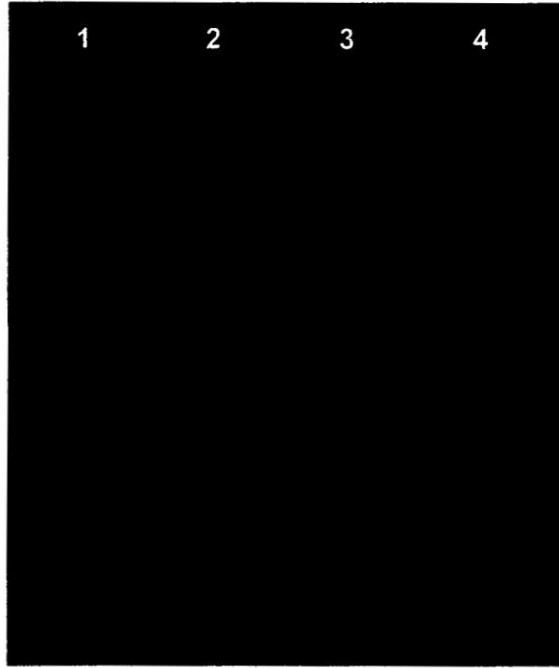


Figura 1: Electroforesis de patrones de bandas de ADN genómico extraído de ADN de linfocitos humano a diferentes concentraciones, en gel de agarosa al 1%.

Leyenda:

Carril N° 1: 60 ng de ADN genómico de ADN de linfocito humano.

Carril N° 2: 120 ng de ADN genómico de ADN de linfocito humano.

Carril N° 3: 180 ng de ADN genómico de ADN de linfocito humano.

Carril N° 4: 240 ng de ADN genómico de ADN de linfocito humano.

Volumen de carga: Muestra (4 μ L, 8 μ L, 12 μ L, 16 μ L en carril 1, 2, 3 y 4 respectivamente) + loading (2 μ L).

Condiciones de electroforesis: 50 voltios por 2 horas.

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



Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano a 700 ng/ μ L, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 100%, 25% y 50% a 37°C durante 1 hora respectivamente.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 100% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 2: Con 25% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 3: Con 50% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Volumen de carga: Muestra (4 μ L) + loading (2 μ L) = 6 μ l.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por 4 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% por 5 minutos

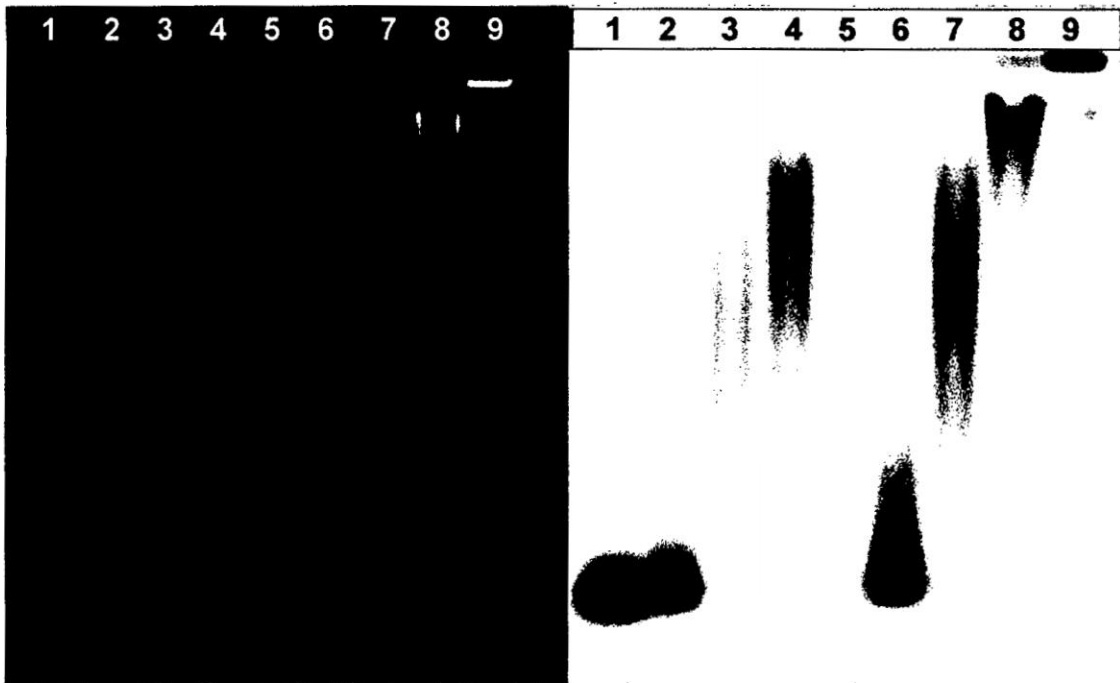


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/μL, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%, durante 1 y 4 horas de incubación a 37°C. Ayacucho, 2013.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 100% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 2: Con 50% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 3: Con 25% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 4: Con 10% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 5: Con 100% de látex de "leche leche", durante 4 horas.

Carril N° 6: Con 50% de látex de "leche leche", durante 4 horas.

Carril N° 7: Con 25% de látex de "leche leche", durante 4 horas.

Carril N° 8: Con 10% de látex de "leche leche", durante 4 horas.

Carril N° 9: ADN de linfocitos humano a concentración de 1500 ng/μL (control).

Volumen de carga: Muestra (5 μL) + loading (2 μL) + agua PCR (2 μL) = 9 μL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por 5 horas.

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

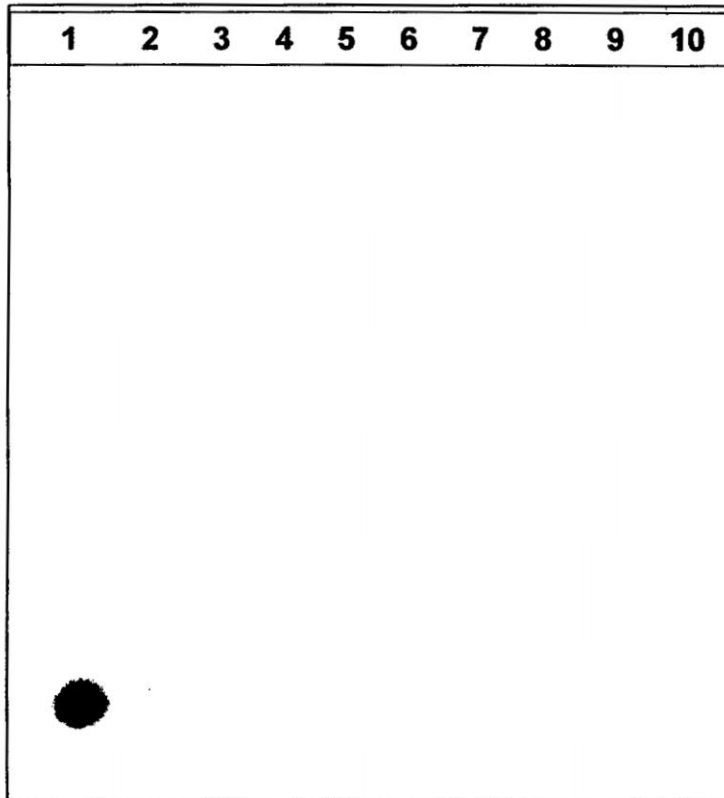


Figura 4. Reproducibilidad del efecto genotóxico del ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/μL, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% a 37°C durante 1 y 4 horas de incubación a 37°C; y marcador de tamaño molecular de 100pb, en electroforesis con gel de agarosa al 1%.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 100% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 2: Con 50% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 3: Con 25% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 4: Con 10% de látex de "leche leche", durante 1 hora.

Carril N° 5: Con 100% de látex de "leche leche", durante 4 horas.

Carril N° 6: Con 50% de látex de "leche leche", durante 4 horas.

Carril N° 7: Con 25% de látex de "leche leche", durante 4 horas.

Carril N° 8: Con 10% de látex de "leche leche", durante 4 horas.

Carril N° 9: Ladeer (moderador de PM 100pb)

Carril N° 10: ADN de linfocitos humano a concentración de 1500 ng/μL (control).

Volumen de carga: Muestra (5 μL) + loading (2 μL) + agua PCR (2 μL) = 9 μL.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por 5 horas.

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

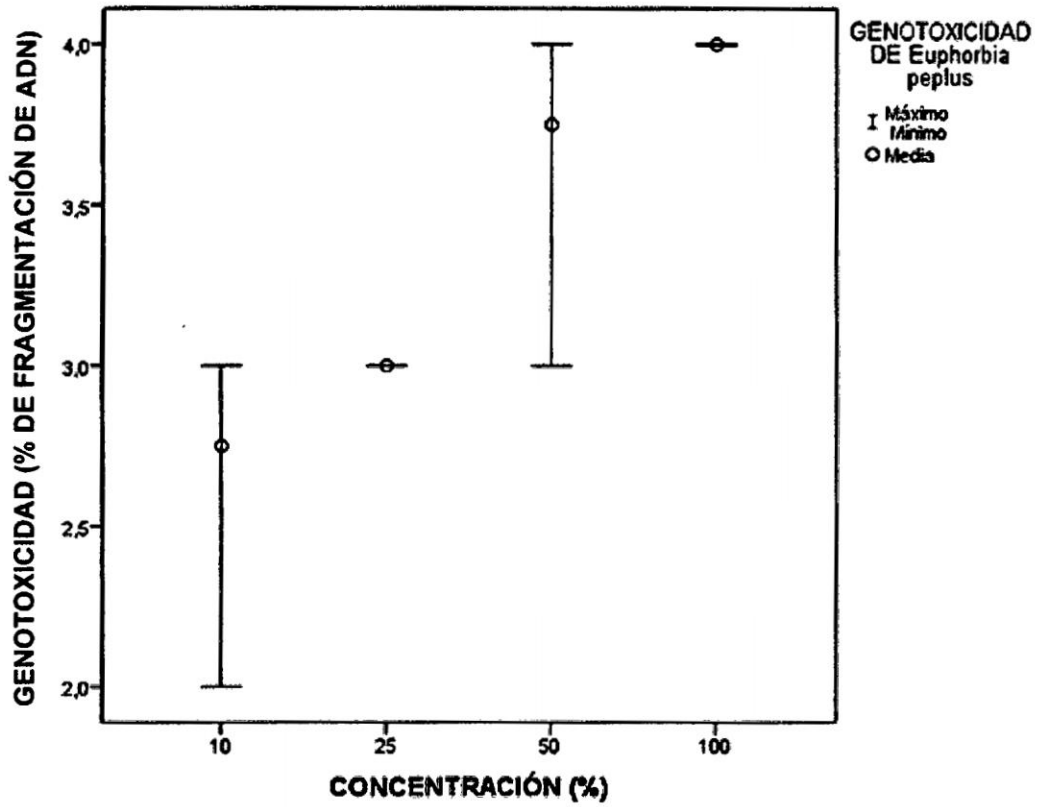


Figura 5. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones, durante 1 hora de incubación a 37°C.

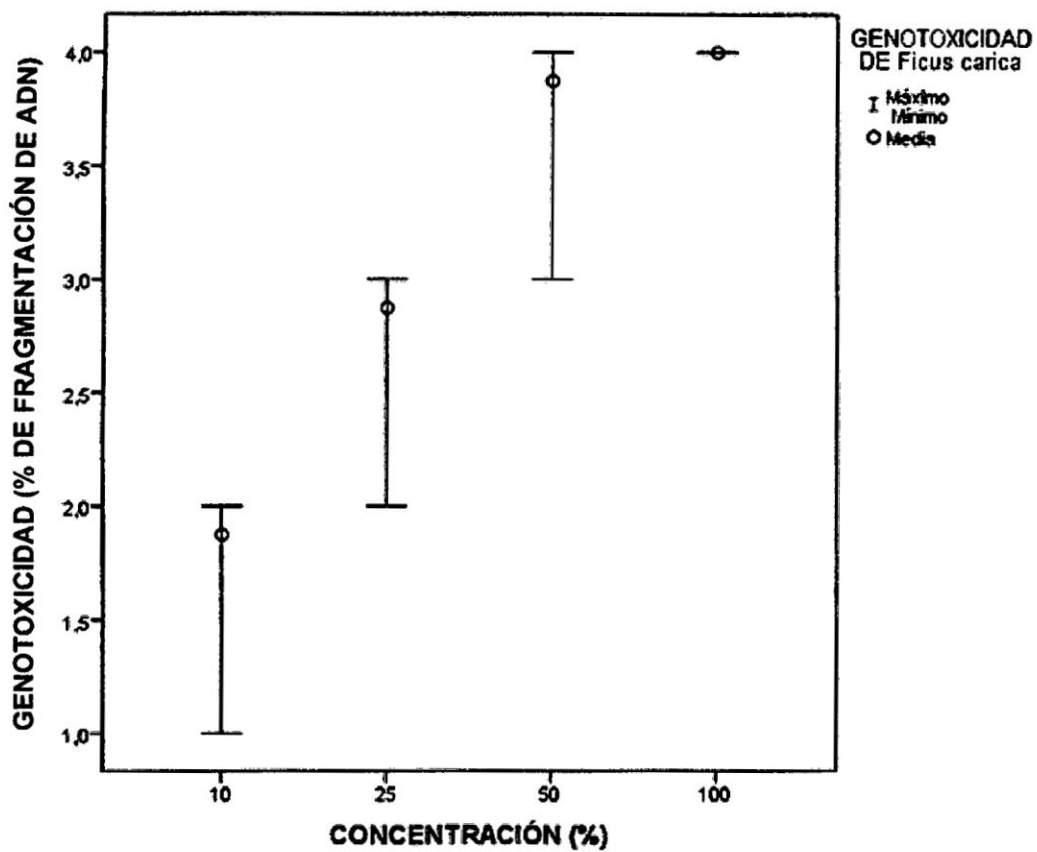


Figura 6. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones, durante 4 horas de incubación a 37°C.



Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano a 1000 ng/ μ L, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% incubados durante 1 y 4 horas a 37°C.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 100% de látex de "higo", durante 1 hora.

Carril N° 2: Con 50% de látex de "higo", durante 1 hora.

Carril N° 3: Con 25% de látex de "higo", durante 1 hora.

Carril N° 4: Con 10% de látex de "higo", durante 1 hora.

Carril N° 5: Con 100% de látex de "higo", durante 4 hora.

Carril N° 6: Con 50% de látex de "higo", durante 4 hora.

Carril N° 7: Con 25% de látex de "higo", durante 4 hora.

Carril N° 8: Con 10% de látex de "higo", durante 4 hora.

Carril N° 9: ADN de linfocitos humano a concentración de 1500 ng/ μ L (control).

Volumen de carga: Muestra (4 μ L) + loading (2 μ L) + agua PCR (2 μ L) = 8 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por 5 horas.

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

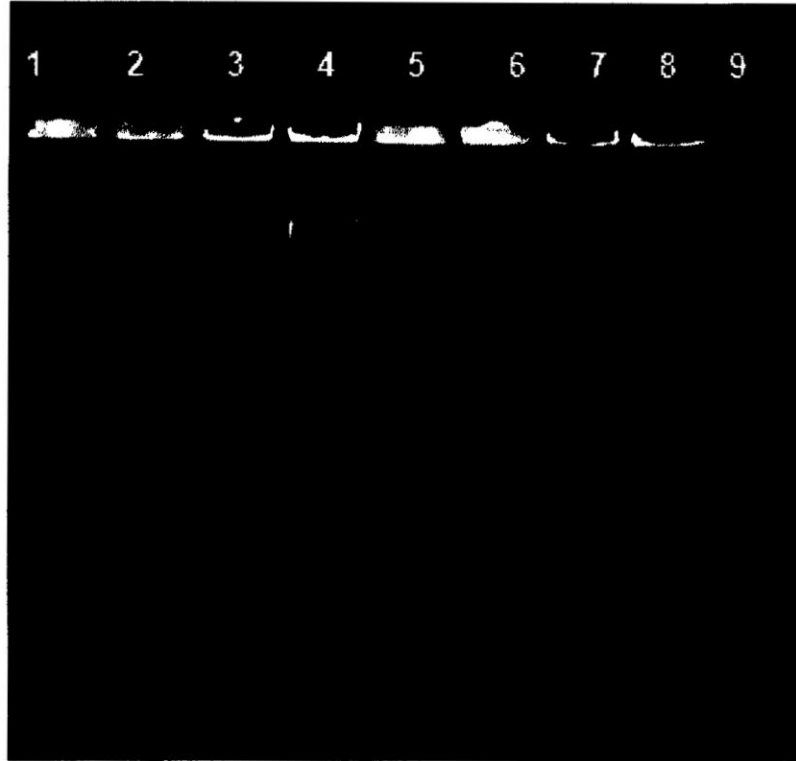


Figura N° 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/ μ L, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% durante 1 y 4 horas a 37°C.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 100% de látex de "higo", durante 1 hora.

Carril N° 2: Con 50% de látex de "higo", durante 1 hora.

Carril N° 3: Con 25% de látex de "higo", durante 1 hora.

Carril N° 4: Con 10% de látex de "higo", durante 1 hora.

Carril N° 5: Con 100% de látex de "higo", durante 4 horas.

Carril N° 6: Con 50% de látex de "higo", durante 4 horas.

Carril N° 7: Con 25% de látex de "higo", durante 4 horas.

Carril N° 8: Con 10% de látex de "higo", durante 4 horas.

Carril N° 9: ADN de linfocitos humano a concentración de 1500 ng/ μ L (control).

Volumen de carga: Muestra (4 μ L) + loading (2 μ L) + agua PCR (2 μ L) = 8 μ L.

Condiciones de electroforesis: 30 voltios por 5 horas.

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

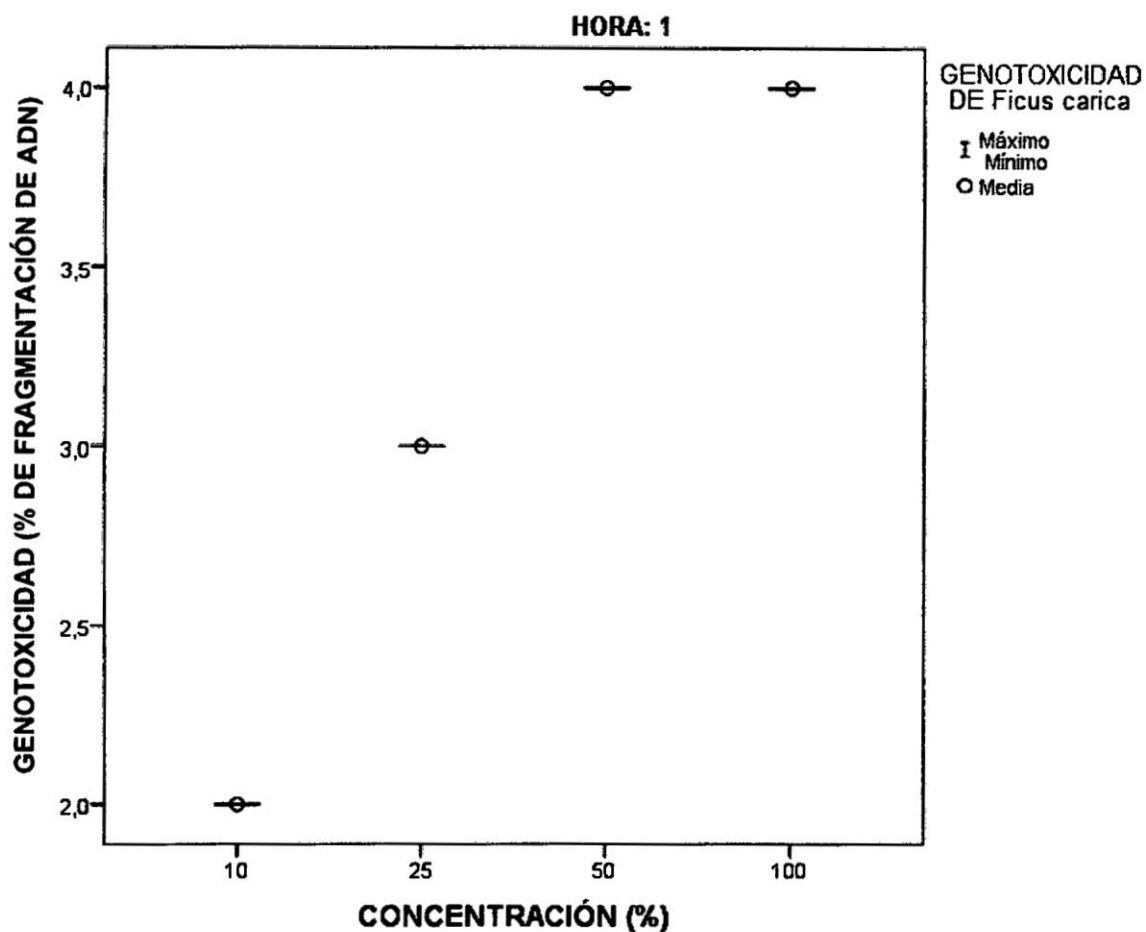


Figura 9. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones, durante 1 hora de incubación a 37°C.

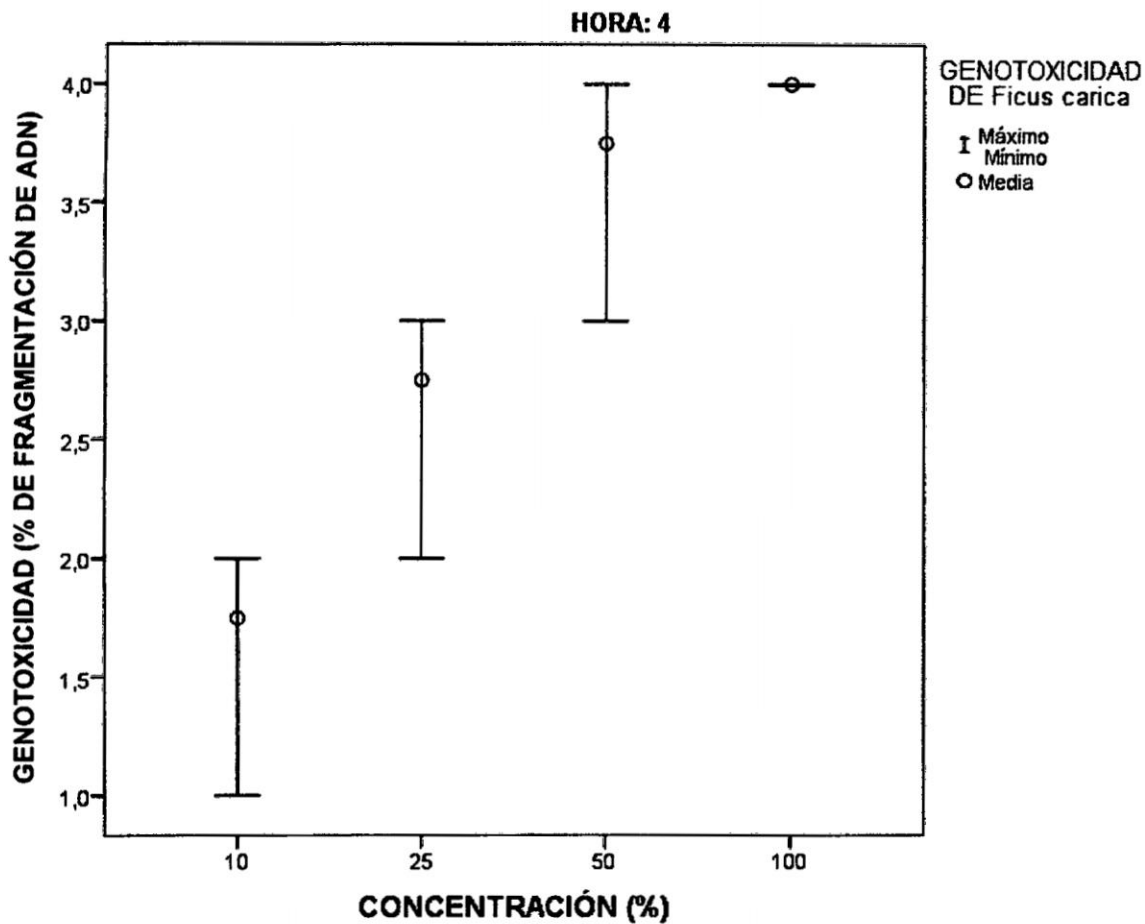


Figura 10. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones, durante 4 horas de incubación a 37°C.

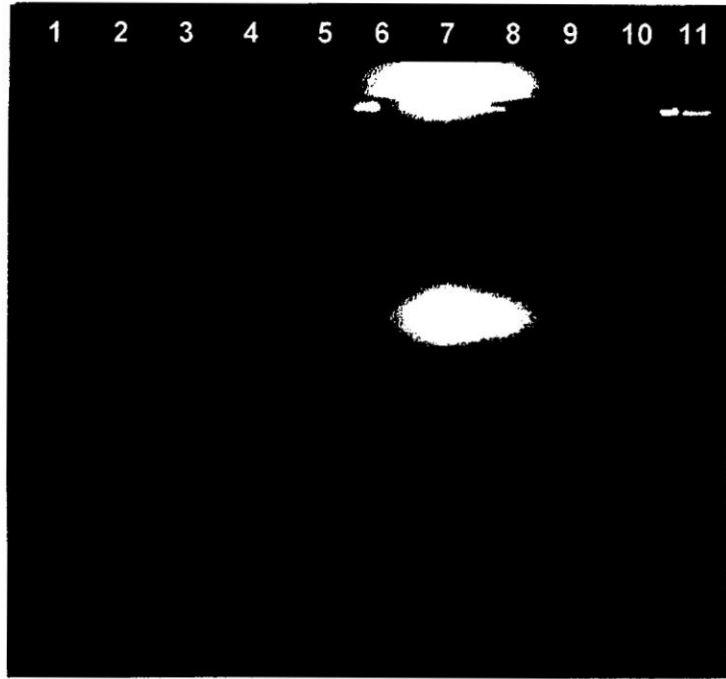


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad de ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/μL, como prueba control con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%.

Leyenda:

Carril N° 1: Látex al 100% de "leche leche" con ADN.

Carril N° 2: Látex al 100% de "leche leche" sin ADN.

Carril N° 3: Látex al 50% de "leche leche" sin ADN.

Carril N° 4: Látex al 25% de "leche leche" sin ADN.

Carril N° 5: Látex al 10% de "leche leche" sin ADN.

Carril N° 6: Látex al 100% de "higo" con ADN.

Carril N° 7: Látex al 100% de "higo" sin ADN.

Carril N° 8: Látex al 50% de "higo" sin ADN.

Carril N° 9: Látex al 25% de "higo" sin ADN.

Carril N° 10: Látex al 10% de "higo" sin ADN.

Carril N° 11: ADN de linfocitos humano a concentración de 1500 ng/μl (control).

Volumen de carga: Muestra (4 μL) + loading (2 μL) + agua PCR (2 μL) = 8 μL.

Condiciones de electroforesis: 80 voltios por 1 hora.

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

V. DISCUSIÓN

La evaluación genotóxica de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos “*in vitro*” si es que resultara negativo se prosigue con el ensayo “*in vivo*”, para demostrar el daño a nivel del ADN.²¹

Por ello en el presente trabajo de investigación de desarrollo la actividad genotóxica *in vitro* a las plantas medicinales *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo” por medio de electroforesis en gel. Como primera instancia se realizó el tamizaje fitoquímico del látex de la *Euphorbia peplus* L. “leche leche” desarrollado según la técnica de Lock de Ugaz³³ y Miranda M³⁴ en el cual se reporta la presencia de los metabolitos secundarios como: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos y flavonoides; además se identificó la presencia de saponinas, principios amargos y astringentes (Tabla 4), lo cual coincide con un reporte anterior.⁶

La tabla 5 muestran los metabolitos secundarios del látex de *Ficus carica* L. “higo”, tales como: alcaloides, lactonas y/o cumarinas y flavonoides; además de principios amargos y astringentes. Estudios realizados nos confirma la presencia de estos metabolitos encontrados.⁴⁰

Los resultados presentados en la tabla 6 es referido a la cuantificación del ADN genómico extraído de linfocitos humano mediante espectrofotometría, a partir de un mL de sangre, se midió la absorbancia A260 nm de longitud de onda para

determinar la concentración de ADN y A280 para las proteínas, la concentración de ADN obtenida va de los valores de 1389,9 ug/mL hasta 5306,4 ug/mL, además de tomar en cuenta que el nivel de pureza óptimo debe ser entre 1.8 a 2.0 y se observa que cuatro de ellas están dentro de ese rango con excepción de la tercera y cuarta muestra.³²

La figura 1 muestra patrones de bandas de ADN extraído de linfocito humano los mismos que han sido llevados a concentraciones conocidas a partir de la solución madre del ADN obtenido a partir de 1 mL de sangre y determinado su concentración por espectrofotometría UV, fue corrido en agarosa al 1%; en el carril 1 tenemos el corrido de ADN a una concentración de 60 ng, en el carril 2 de 120 ng, en el carril 3 de 180 ng y en el 4 de 240 ng, estas fueron sembradas a partir de un solo tubo de ADN que nos permita ver la relación directa entre la concentración de ADN, el tamaño de las bandas y la intensidad del color del bromuro de etidio por efecto de la luz ultravioleta, así como la distancia que ha recorrido con 50 voltios durante dos horas.

El registro fotográfico de la figura 2 muestra los productos de la genotoxicidad de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" sobre el ADN de linfocito humano a 700 ng/uL, incubada durante 1 hora en baño maría a 37°C, se percibe la presencia de fragmentos de ADN de tamaño disperso de menor a mayor (abajo hacia arriba) en el carril 2 correspondiente a la concentración de 25% de látex, con una fuerte luminiscencia, mientras que en los carriles 1 y 3 son fragmentos mucho más pequeños con 100% y 50%, respectivamente; dando señal del efecto genotóxico, por lo que es necesario realizar los ensayos a otras concentraciones para que nos permita visualizar mejor este fenómeno.

El ensayo con mayor concentración de ADN se muestra en la figura 3, revela muy claramente la fragmentación del ADN de linfocitos humano a 1500 ng/μL, por el efecto genotóxico de látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a

diferentes concentraciones porcentuales, el carril 1 (100%), carril 2 (50%), carril 3 (25%) y carril 4 (10%) incubados a 37°C por 1 hora; carril 5 (100%), carril 6 (50%), carril 7 (25%) y carril 8 (10%) incubados a 37°C por 4 horas, el carril 9 con ADN de linfocito humano a concentración de 1500 ng/μL como control. Podemos visualizar que el látex al 100% en el carril 1, ha degradado el ADN a fragmentos pequeños menores de 300 pb comparando con el recorrido del loading correspondiente al azul de bromofenol, mostrando una masa compacta de tamaño homogéneo con refringencia de color naranja e intensa por su alta concentración; el carril 2 muestra similar genotoxicidad, pero con fragmentos ligeramente más grandes que las del carril 1, el carril 3 muestra el efecto genotóxico con fragmentos de ADN de tamaño diverso y dispersos en la trayectoria del carril a razón de su tamaño de aproximadamente 300 pb hasta 10 000 pb (de abajo hacia arriba), y en el carril 4, con efecto parecido al anterior, pero con rango de fragmentos mayores a 10 000 pb. El carril 5, respecto al carril 1, revela un mayor efecto genotóxico a punto de desintegrar la totalidad de ADN, por el tiempo de incubación de 4 horas, mientras que los carriles 6, 7 y 8 son similares a los carriles 2, 3 y 4. El carril 9 de control, nos sirve para comparar los recorridos electroforéticos a razón del tamaño de las moléculas de ADN, pues ella ha recorrido poco espacio y por su alta concentración, parte de ella ha quedado atrapado en el pozo del gel.

Similar actividad se ve en la figura 4, que traduce la reproducibilidad del ensayo, con la fragmentación del ADN de linfocitos humanos a 1500 ng/ μL, por el efecto genotóxico del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones porcentuales, el carril 1 (100%), carril 2 (50%), carril 3 (25%) y carril 4 (10%) incubados a 37°C por 1 hora; carril 5 (100%), carril 6 (50%), carril 7 (25%) y carril 8 (10%) incubados a 37°C por 4 horas, el carril 9 muestra un paquete de bandas comprimidas del marcador de tamaño molecular (ladder de

100 pb), donde la parte inferior refiere 500 pb y la parte superior indica 1 500 pb (aproximadamente), el carril 10 con ADN de linfocito humano a concentración de 1 500 ng/ μ L como control. Podemos visualizar que el látex al 100% en el carril 1, ha degradado el ADN a fragmentos pequeños menores de 300 pb comparando con el recorrido del ladder de 100 pb, mostrando una masa compacta de tamaño homogéneo de color negro intenso por su alta concentración; el carril 2 muestra similar genotoxicidad, con fragmentos menores de 500 pb, el carril 3 con fragmentos de ADN de tamaño diverso y dispersos en la trayectoria del carril a razón de su tamaño de aproximadamente 500 pb hasta 10 000 pb (de abajo hacia arriba), el carril 4, con efecto parecido al anterior, pero con el rango superior de fragmentos mayores a 10 000 pb. El carril 5, respecto al carril 1, revela un mayor efecto genotóxico a punto de desintegrar la totalidad de ADN, por el tiempo de incubación de 4 horas, mientras que los carriles 6, 7 y 8 son similares a los carriles 2, 3 y 4. El carril 10 de control, nos sirve para comparar los recorridos electroforéticos a razón del tamaño de las moléculas de ADN, pues ella ha recorrido poco espacio y por su alta concentración, parte de ella ha quedado atrapado en el pozo del gel.

Según los estudios de Ejchart A, 2003.,³⁸ los parámetros validados para determinar el daño evaluado mediante el ensayo cometa fueron: migración del ADN, concentración de ADN en la cola, momento de cola, y momento Olive, entre otros. En este estudio se utilizó como parámetro de medida la longitud de cola (μ m); de acuerdo con este valor, se clasificó arbitrariamente, el tipo de daño en cinco categorías: 0, células sin daño (0-18 μ m); 1, células con daño bajo (19-37 μ m); 2, células con daño medio (38-56 μ m); 3, células con daño alto (57-75 μ m) y 4, células con daño total (mayor de 75 μ m). Otro parámetro que se tuvo en cuenta para los análisis de genotoxicidad, fue la frecuencia de células dañadas en cada tratamiento.

Al analizar de manera general los dos tiempos de incubación con la prueba de Mann-Whitney (Anexo 10) podemos corroborar que el tiempo no influye en el efecto genotóxico ($p=0.539$) del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche"; como se observa en las figuras 3 y 4, que a menor tiempo de incubación la genotoxicidad es muy notoria. Mientras que la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico de la "leche leche", ($p=0,000$). (Anexo11).

La figura 5 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ($p=0.008$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 12).

La figura 6 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0.014$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 12).

Estos resultados, lo podemos corroborar en el estudio de Reynoso, 2011.,³⁷ menciona que la genotoxicidad depende de la concentración del extracto. No existen reportes previos acerca de este comportamiento, pero es sabido que las dosis elevadas de cualquier genotóxico inducen un alto nivel de ruptura en el ADN, lo cual, puede ocasionar la aparición de caudas sumamente largas (y por lo tanto no perceptibles al microscopio), lo que conduce a una cuantificación a la baja de caudas. Concentraciones menores ocasionan daño genético no tan severo produciendo caudas más visibles y, aparentemente más largas; explicaciones de esta aparente paradoja, lo reportan diferentes estudios de ensayos de electroforesis de una sola célula "ensayo cometa".

En el registro fotográfico de la figura 7, de electroforesis en gel de agarosa al 1% nos muestra los productos de la genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN de linfocitos humanos a 1000 ng/μl, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% incubados a 37°C; los carriles 1 y 2 muestran una actividad mayor a 95%, los carriles 3 y 4 de 40 a 95%, durante 1 hora de incubación. Durante 4 horas de incubación, el carril 5 mayor a 95% de fragmentación de ADN, el carril 6 de 40 a 95%, los carriles 7 y 8 entre 20 a 40% de fragmentación; se puede apreciar que gradualmente se forma las "colas" del corrido de fragmentos de ADN en cada carril, cada vez más larga que las anteriores; el carril 9 muestra el espacio recorrido del ADN control a 1000 ng/μL, que nos permite comparar con los productos fragmentados.

En otro ensayo realizado a la planta en estudio demostró que el registro fotográfico de la figura 8, de electroforesis en gel de agarosa al 1%, revela la actividad de genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, inducida por el látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% incubados a 37°C; los carriles 1 y 2 muestran una actividad mayor a 95%, los carriles 3 de 40 a 95% y el carril 4 de 20 a 40%, durante 1 hora de incubación. Durante 4 horas de incubación, los carriles 5 y 6 mayor a 95%, los carriles 7 y 8 entre 20 a 40% de fragmentación; se puede apreciar que gradualmente se forma las "colas" del corrido de fragmentos de ADN en cada carril, cada vez más larga que las anteriores; el carril 9 muestra el espacio recorrido del ADN control a 1 500 ng/μL, que nos permite comparar con los productos fragmentados. Nótese que las refringencias que emanan de los pozos del gel en los carriles 1, 2, 5 y 6, no son de color naranja que indicaría presencia de ADN, por el contrario son de color blanco que corresponde a restos del látex de la planta en estudio.

Estos productos fragmentados de ADN lo contrastamos según un estudio realizado por Ortiz I. *et al*, 2012,³⁹ quienes evaluaron la genotoxicidad por medio del ensayo cometa alcalino que se basa en que los daños en el ADN nuclear generados por un agente genotóxico que no causa ligamientos cruzados, produce fragmentos de ADN de bajo peso molecular, generados por rupturas directas de cadena doble o sencilla, o indirectamente, por reparación por escisión incompleta o por la formación de sitios lábiles al álcali. Estos fragmentos de ADN se liberan durante el período de desnaturalización alcalina y generan la cola del cometa durante la electroforesis. El ADN de alto peso molecular no migra y forma la cabeza del cometa. Así, mientras mayor sea el daño y la fragmentación generados por el compuesto genotóxico, mayor será la longitud de la cola del cometa.

Al analizar de manera general los dos tiempos de incubación con la prueba de Mann-Whitney (Anexo 13) podemos corroborar que el tiempo no influye en el efecto genotóxico ($p=0.669$) del látex de *Ficus carica* L. “higo”; como se observa en la figura 8, que a menor tiempo de incubación la genotoxicidad es muy notoria. Mientras que la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico de la “leche leche”, ($p=0,000$). (Anexo14).

La figura 9 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. “higo” a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ($p=0.002$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 15).

La figura 10 muestra la gráfica de genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. “higo” a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0.005$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico. (Anexo 15).

Mediante el estudio de Villalba, 2013.,⁴⁰ Las furocumarinas cumplen con la función de incluirse en la formación de entrecruzamientos entre las hebras del DNA, que tienen el inconveniente de no poder ser reparados con facilidad por los mecanismos de reparación del material genético, resultando ser mutagénicos y carcinogénicos; motivo por el cual explicaría nuestros resultados obtenidos.

Como prueba final se desarrolló el ensayo que se muestra en la figura 11, que nos permite visualizar la actividad de genotoxicidad de ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/ μ l, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, en los carriles 1 y 6 respectivamente, la genotoxicidad de "leche leche" presenta fragmentos de ADN de aproximadamente 100 a 500 pb, mientras que con el "higo" el ADN fue totalmente fragmentado y obsérvese que la refringencia del pozo correspondiente no es de color naranja, sino blanquecino que correspondería a restos del látex; ambos comparados con el carril 11 que muestra el ADN control a 1500 ng/ μ L. Los carriles 2, 3, 4 y 5 corresponden al látex de "leche leche" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% respectivamente, las mismas que sirven de control para certificar la ausencia de ADN en el látex, lo mismo que los carriles 7, 8, 9 y 10 para el látex del "higo". Nos permitimos comentar la diferencia visual que percibimos entre los carriles de ambos látex, con presencia de sustancias refringentes en el caso del "higo" que estaría evidenciando la diferencia en los componentes de ambos látex.

VI. CONCLUSIONES

- El látex de las plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”, presentan efecto genotóxico *in vitro* sobre el ADN genómico de linfocitos humano.
- Los metabolitos secundarios identificados en látex “leche leche” fueron: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos y flavonoides, además de saponinas y principios amargos y astringentes; y en látex de “higo” alcaloides, lactonas y/o cumarinas y flavonoides, además de principios amargos y astringentes.
- En el efecto de la genotoxicidad del látex de “leche leche” y de “higo”; no influye ($p=0,539$, $p=0,669$) los tiempos de incubación, pero sí ($p=0,000$, $p=0,000$) la concentración del látex.

VII. RECOMENDACIONES

- Desarrollar trabajos de genotoxicidad en cultivos celulares con el “*ensayo cometa*” y ensayos “*in vivo*” para continuar con el conocimiento de estos efectos.
- Ampliar estudios de genotoxicidad con otras plantas medicinales de uso común en nuestra sociedad.
- Identificar los metabolitos secundarios del látex que presentaron actividad genotóxica en este estudio, con el objeto de identificar principios activos útiles en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García A, Ávila Y, Alonso L, López P, Ruiz A, & Morón F, Et al. Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14, 1-11.2009.
2. Craig D, Parsons P. *Euphorbia peplus* una planta con posibles propiedades anticancerígenas. Wildcrafted Herbal Productos [revista en internet]. 2002 enero. [acceso 27 de febrero del 2014]; 10(2). Disponible en: [http://www.wildcrafted.com.au/Articles/Scientific Research/Milkweed for skin cancer.html](http://www.wildcrafted.com.au/Articles/Scientific%20Research/Milkweed%20for%20skin%20cancer.html)
3. Chacua A, "Determinación del proceso tecnológico para la obtención de harina de higo (*Ficus carica* L.) de dos estados de madurez (verde y negra)". [Tesis para optar título]. Universidad Técnica del Norte. Ibarra – Ecuador. 2010
4. Ángel A. Evaluación de la actividad genotóxica de propóleos recolectados en diferentes apiarios de Cundimarca y Boyacá. [tesis maestría]. Bogotá. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. 2012.
5. Rueda E. Aislamiento y purificación de proteasas y una fracción enriquecida en terpenos de látex de *Calotropis procera* Y *Pedilanthus tithymaloides* y evaluación *in vitro* de su efecto citotóxico. [Tesis doctoral]. Universidad Central De Venezuela. Facultad De Agronomía. Venezuela. 2012.
6. Vega R. Efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. "cebolla". [Tesis para optar título]. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2006.
7. Ayala M, Miranda T. Utilización de hemolinfa de *Epicauta* sp. (coleóptera: meloidae) en el tratamiento de las "verrugas" de la piel humana. XXXIV Convención Nacional de Entomología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima Perú. 1992.
8. Yoc A, Soto E, Gutiérrez J y Arriola M. Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia Euphorbiaceae: *Euphorbia lancifolia*, *Cnidioscolus aconitifolius* var. "mansa" y *Cnidioscolus aconitifolius* var. "estrella". [Tesis para optar título]. Universidad de San Carlos de Guatemala. 2012
9. Siller G, Rosen R, Freeman M, Welburn P, Katsamas J, Ogbourne S. Et al. PEP005 (ingenol mebutate) gel for the topical treatment of superficial basal cell carcinoma: results of a randomized phase IIa trial. *Australas J Dermatol*; 51(2):99-105. 2010.
10. Llanes D. Actividad Inmunomoduladora de Extractos de 10 plantas de la familia Euphorbiaceae. [tesis maestría]. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 2009.
11. Itzic, A. Las plantas curativas. Grupo editorial Montevideo. Uruguay. 2006.
12. Gaig P, Bartolom B, Enrique E, Garcia-Ortega P y Palacios R. Et al. Hipersensibilidad a *Ficus benjamina*. Unidad de Alergia. Hospital Universitari Joan XXIII. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona. 2000.
13. Silvers M. "Estudio clínico de la actividad antifúngica del gel con tocte, higo, dulcamara y salvia en niños de la comunidad sanjapamba con

- Malassezia furfur*". [Tesis para optar título]. Escuela Superior Politécnico de Chimborazo. Ribamba. Ecuador. 2012.
14. Carballo M, Cortada C, Gadano A. CIGETOX - Citogenética Humana y Genética Toxicológica. Departamento de Bioquímica Clínica. Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB). UBA. Buenos Aires. Argentina. 2005.
 15. Reyes F. Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, triterpeno pentacíclico de origen natural. [Tesis doctoral]. Universidad de Granada. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Granada. 2007
 16. Mendivelso D, Palacios C, Pinzón A, Victoria M. Estudio morfológico y anatómico de *Euphorbia peplus* linneo (*Euphorbiaceae*). Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Colombia. 2003.
 17. Brunenton J. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Editorial Acribia S.A.Zaragoza España.2001.
 18. Brittner M. Estudio Químico de la Familia Euphorbiaceae en Chile. Boletín de la Sociedad Química Chilena. Vol. 46 N°4, Santiago. 2001.
 19. Ankli A, Heinrich M, Bork P, Wolfram L, Bauerfeind P, Brun R. Et al. Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 43–52. 2002.
 20. Villarreal M, Alonso D, & Melesio G. Cytotoxic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Fitoterapia*, 43, 518–521.1992.
 21. Jakupovic J, Morgernstern T, Bittner M y Silva M. " Diterpenes from *Euphorbia peplus*". *Phytochemistry* 1601 – 1609. 1998.
 22. Hoffmann G. Genetic toxicology. En G. Hoffmann .Quinta Edición. *Toxicology: the basic science of poisons* (pp. 269-300). New York: Cassarett and Doull's. 1996.
 23. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España. 1999.
 24. Baby J, Justin R. Pharmacognostic and Phitochemical propiedades de *Ficus carica* Linn-Una visión general.Unidad de Investigación Interdisciplinaria, Departmentof Biotecnología, Malankar Católicaollege, Mariagiri, KK District, Vol. 3, No. 1, pp 08-12, enero-marzo India.2011.
 25. Consejo de Salubridad Federal. Diagnóstico y tratamiento de verrugas vulgares. Gobierno Federal de México. 2010.
 26. Sociedad Valenciana de Medicina Familiar y Comunitaria. Tratamiento de las verrugas.[revista en internet]. 2008.[acceso 27 de febrero del 2014]. Disponible en: [<http://www.svmfyc.org/Fichas/Indice.asp>]
 27. Lehninger A, Nelson D, Cox M. Principios de Bioquímica. 2da. Edic. Barcelona. Ediciones Omega; 1995.
 28. Lodish H, Berk A, Lawrence Z, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología celular y molecular. 4ª ed. Madrid: Médica Panamericana S.A.; 2002.
 29. Clayton B. y Grant L. The assessment of mutagenicity. Health protection branch mutagenicity guidelines. *Environmental and Molecular Mutagenesis*: Vol. 21:15-37. 1992.
 30. Sánchez A, Fonseca G, Capiro N, & Fernández D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*, 34, 34-43. 2000.
 31. Guzmán-Rincón M, & Graf U. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. En F. Butterworth, L. Corkum, & J. Guzmán-Rincón, *Biomonitoring and biomarkers and indicators of environmental change* (pp. 169-181). New York: Plenum Press. 1995.

32. Carranza Z. Selección e identificación de especies de hongos ectomicorrizógenos del estado de Hidalgo más componentes en medio de cultivo sólido. [Tesis para optar título]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Tulancingo de Bravo Hgo. 2006.
33. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. 2da Edición. Fondo editorial; 1994.
34. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba. 2000.
35. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular – Guía de Práctica. Edit. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
36. Larrea Poma M. evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay [tesis].la Paz. Universidad Mayor de San Andrés. 2007.
37. Reynoso M. Evaluación de la genotoxicidad de compuestos aislados de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco. Mexico.2011.
38. Ejchart A, Sadlej-Sosnowska N. Statistical. Evaluation and comparison of comet assay results. Mutat Res. [revista en internet]. 2003. [acceso 27 de marzo del 2014]; 13(5). Disponible en:
[http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00250-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00250-4).
39. Ortiz I, Peláez C, Orozco L & Zuleta M. Interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias mediante ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos. Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2012.
40. Villalba C. Elaboración y control de calidad de un gel astringente a base de *costus spicatus*, *ficus carica*, *salvia officinalis*". [Tesis de grado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Farmacia y Bioquímica. Riobamba-Ecuador. 2013

ANEXOS

Anexo 1

Certificado de identificación taxonómica de *Euphorbia peplus* L. "leche leche".



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. Lizbeth, PILLACA UNTIVEROS**,
ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.
Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación
de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	EUPHORBIALES
FAMILIA	:	EUPHORBIACEAE
GÉNERO	:	Euphorbia
ESPECIE	:	<i>Euphorbia peplus</i> L.
N V	:	"leche leche"

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

Ayacucho, 24 de Marzo del 2014

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

Dña. Lizbeth PILLACA UNTIVEROS
Jefe

Anexo 2

Certificado de identificación taxonómica de *Ficus carica* L. "higo".



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. Lizbeth, PILLACA UNTIVEROS**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	HAMAMELIDAE
ORDEN	URTICALES
FAMILIA	MORACEAE
GÉNERO	Ficus
ESPECIE	<i>Ficus carica</i> L.
N V.	"higuera"

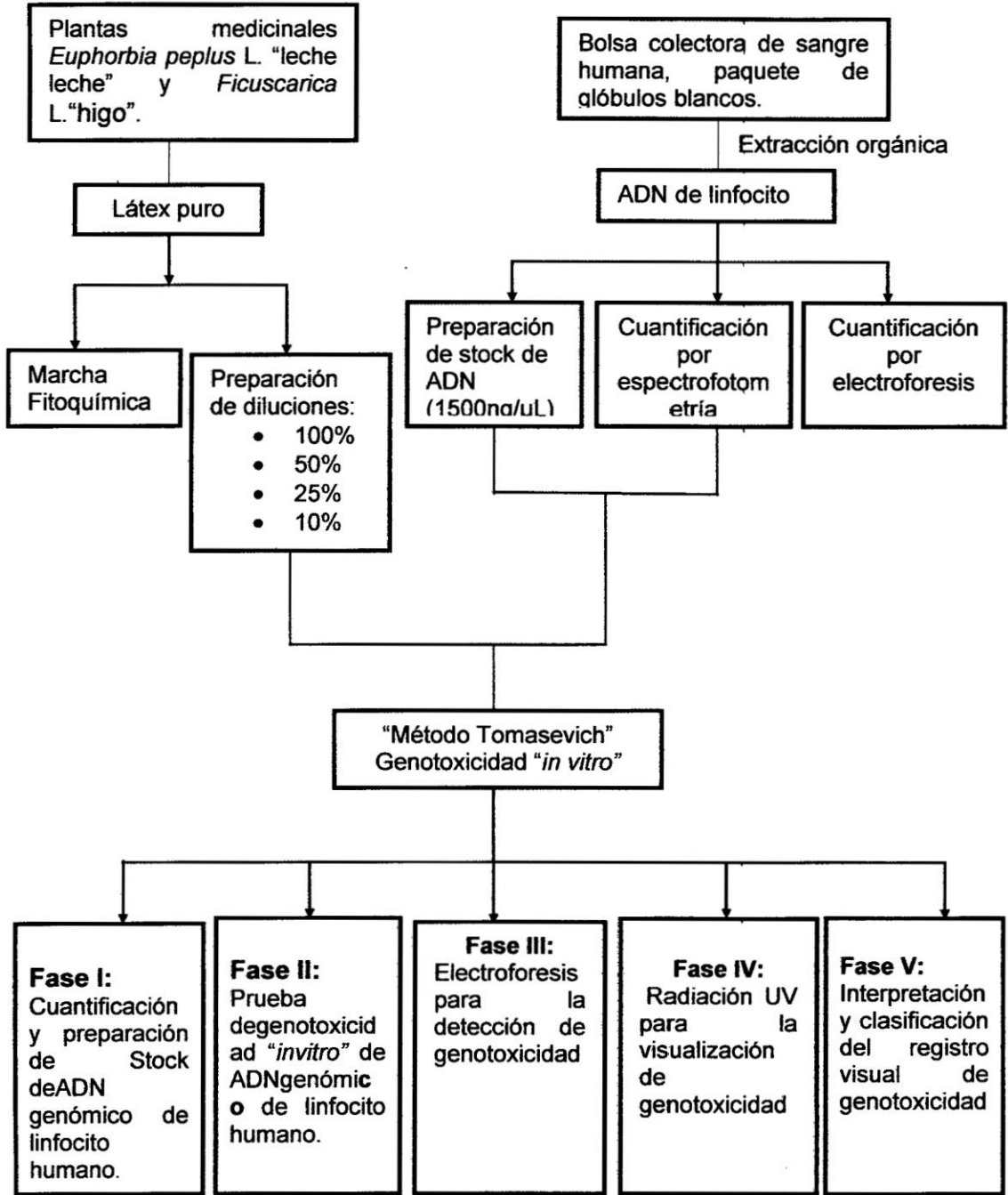
Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 24 de Marzo del 2014

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

Dña. Laura Rocío Medina
JEFE

Anexo 3



Flujograma del "Método Tomasevich" para determinar la actividad genotóxica "in vitro" de plantas medicinales propuesto por Miranda³⁵.

Anexo 4

Tabla 7. Características del ensayo fitoquímico de metabolitos secundarios.

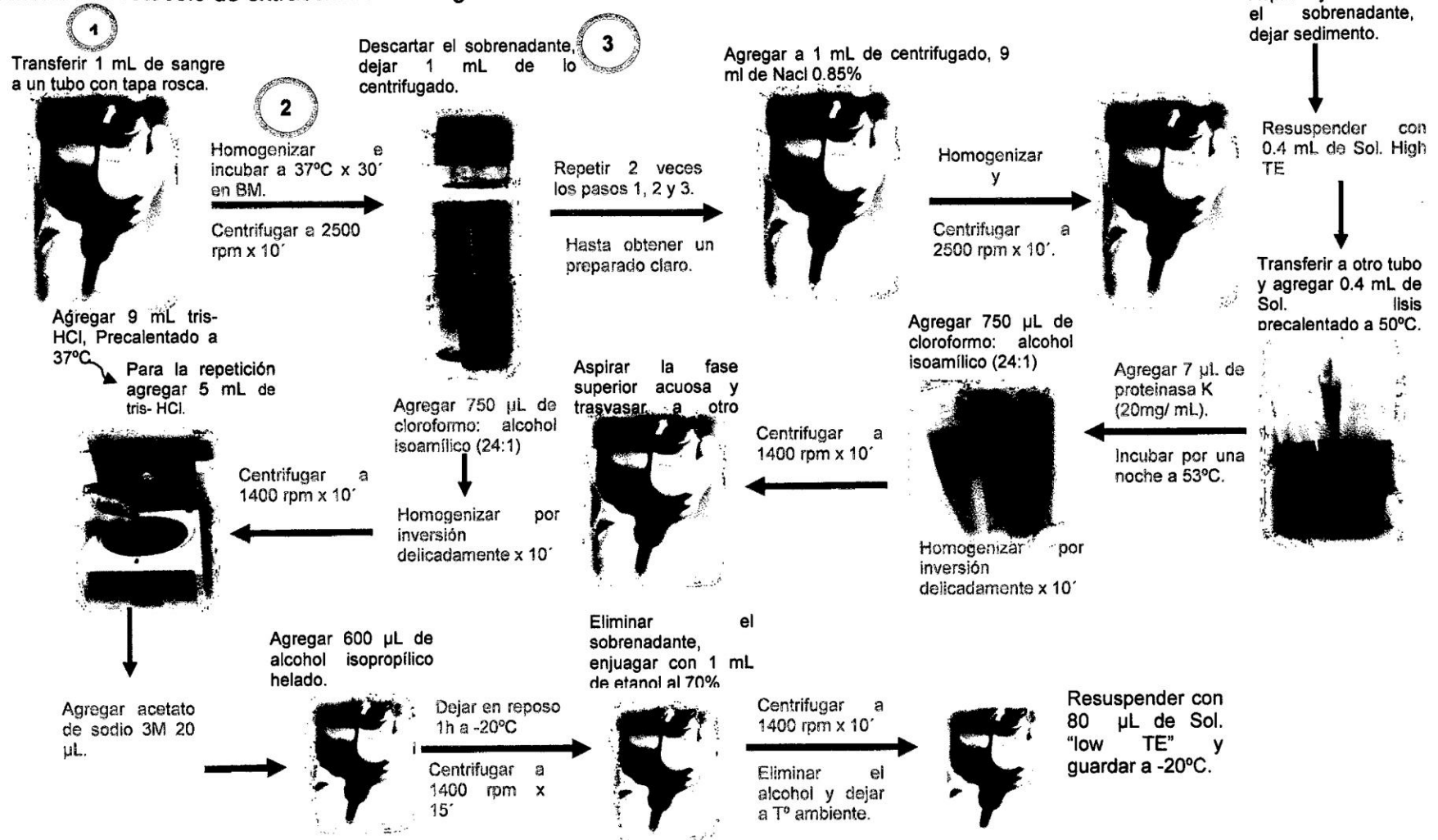
Metabolitos Secundarios	Ensayos con Reactivos	Observación
Alcaloides	Dragendorff	Hay formación de precipitado en todas las reacciones.
	Mayer	
	Hager	
	Wagner	
Lactonas y Cumarinas	Baljet	Formación de una coloración naranja.
Flavonoides	Shinoda	Hay coloración amarilla, naranja,
Quinonas	Borntrager	Si es positivo la fase amoniacal es de color rojizo o rosada.
Catequinas	Catequinas	Coloración verde carmelita a luz UV, indica un ensayo positivo.
Saponinas	Espuma	Si es positivo hay formación de espuma en la superficie.
Azucres reductoras	Benedict	Si es positivo hay formación de precipitado rojo ladrillo.
Taninos y Fenoles	Cloruro Férrico	Formación de una coloración negruzca.
Aminas (aminoácidos)	Ninhidrina	Hay coloración violeta.
Cardenólidos	Kedde	Coloración violácea.

Anexo 5



Fotografía de la recolección de la *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo".

Anexo 6: Protocolo de extracción de ADN genómico de linfocito humano.

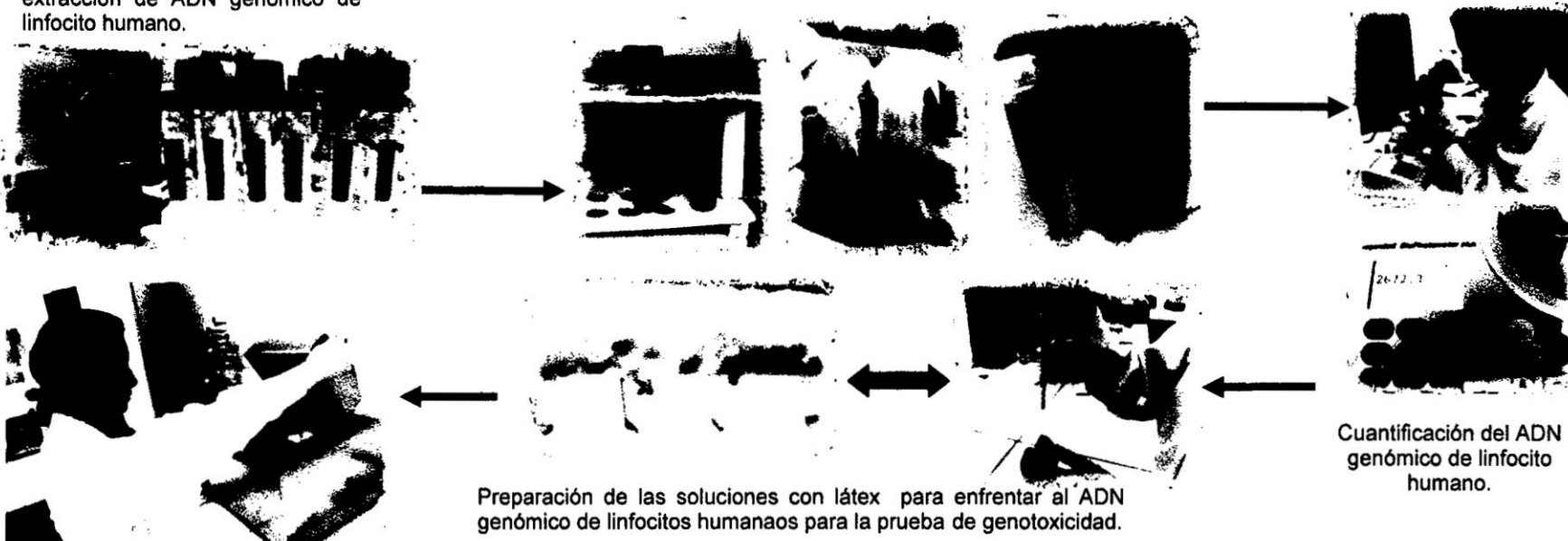


Anexo 7

Protocolo para la determinación del efecto genotóxico *in vitro* mediante electroforesis, propuesto por Miranda T.

Preparación de reactivos para la extracción de ADN genómico de linfocito humano.

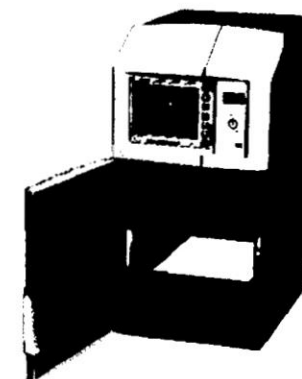
Extracción del ADN genómico de linfocito humano.



Sembrado en el gel de agarosa para electroforesis.



Luego de colorear en bromuro de etidio, se registró las imágenes en el Biometra UVsolo TS; luego con una cámara fotográfica.



Anexo 8

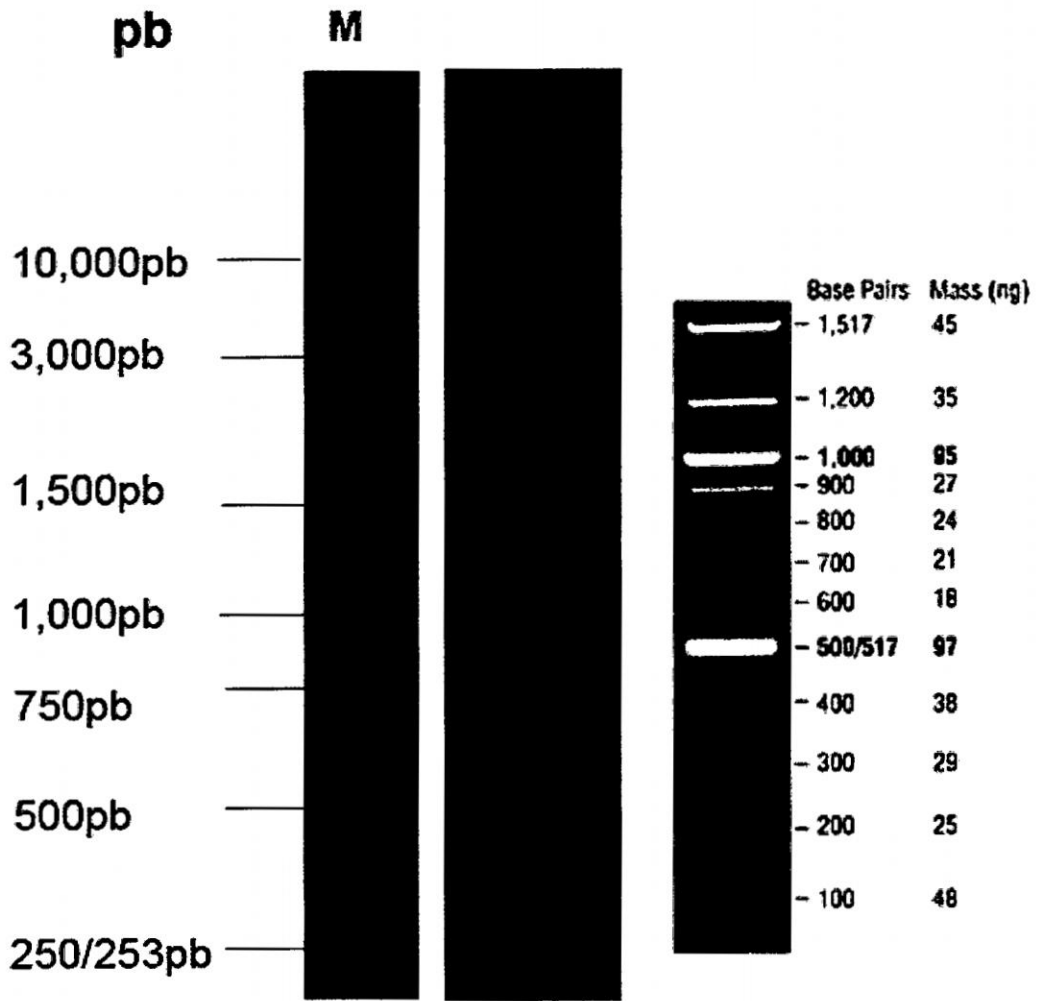


Figura 20: Ladeer (Marcador de tamaño molecular de 100pb)

Anexo 9

Tabla 8. Valores numéricos del grado de genotoxicidad de las plantas medicinales en estudio.

Tiempo de incubación (h)	Concentración del látex %							
	Leche				Higo			
	100	50	25	10	100	50	25	10
1	4	4	3	3	4	4	3	2
1	4	4	3	3	4	4	3	2
	4	3	3	3	4	4	3	2
	4	4	3	2	4	4	3	2
4	4	4	3	3	4	4	3	2
4	4	4	2	3	4	3	2	1
	4	3	3	2	4	4	3	2
	4	3	3	1	4	4	3	2

Anexo 10

Tabla 9. Prueba de Mann-Whitney del tiempo de incubación de *Euphorbia peplus* L. "leche leche".

Categorización en tiempo	N	Rango de promedio	Suma de rangos
1	16	17,56	281,0
4	16	15,44	247,0
Estadísticos de prueba			
U de Mann-Whitney			111,0
W de Wilconxon			247,0
Z			-0,703
Sig. asintótica (bilateral)			0,482
Significación exacta [2* (Sig. unilateral)]			0,539

- a. Variable de agrupación: tiempo (h)
- b. No corregido para empates

Anexo 11

Tabla 10. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración de *Euphorbia peplus* L. "leche leche".

Categorización por concentración (%)	N	Rango promedio
10	8	8,38
25	8	10,88
50	8	20,75
100	8	26,00
Estadísticos de prueba		
Chi-cuadrado		22,562
gl		3
Sig. asintótica		0,000

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: concentración (%)

Anexo 12

Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración en dos tiempos de incubación de *Euphorbia peplus* L. "leche leche".

Categorización por tiempo (h)	Concentración (%)	N	Rango de promedio
	10	4	4,38
	25	4	5,50
1	50	4	11,13
	100	4	13,00
	total	16	
	10	4	4,38
	25	4	5,88
4	50	4	10,25
	100	4	13,50
	total	16	
Estadísticos de prueba			
		Chi-cuadrado	11,813
	1	gl	3
		Sig. asintótica	0,08
tiempo		Chi-cuadrado	10,606
	4	gl	3
		Sig. asintótica	0,014

- a. Prueba de Kruskal-Wallis
- b. Variable de agrupación: concentración (%)

Anexo 13

Tabla 12. Prueba de Mann-Whitney del tiempo de incubación de *Ficus carica* L. "higo".

Categorización en tiempo	N	Rango de promedio	Suma de rangos
1	16	17,25	276,0
4	16	15,75	252,0
Estadísticos de prueba			
U de Mann-Whitney		116,0	
W de Wilconxon		252,0	
Z		-0,486	
Sig. asintótica (bilateral)		0,627	
Significación exacta [2 [*] (Sig. unilateral)]		0,669	

- a. Variable de agrupación: tiempo (h)
- b. No corregido para empates

Anexo 14

Tabla 13. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración de *Ficus carica* L. "higo".

Categorización por concentración (%)	N	Rango promedio
10	8	4,94
25	8	12,50
50	8	23,56
100	8	25,00
Estadísticos de prueba		
Chi-cuadrado		28,516
gl		3
Sig. asintótica		0,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración (%)

Anexo 15

Tabla 14. Prueba de Kruskal-Wallis de la concentración en dos tiempos de incubación de *Ficus carica* L. "higo".

Categorización por tiempo (h)	Concentración (%)	N	Rango de promedio
1	10	4	2,50
	25	4	6,50
	50	4	12,50
	100	4	12,50
	total	16	
4	10	4	2,88
	25	4	6,50
	50	4	11,63
	100	4	13,00
	total	16	
Estadísticos de prueba			
1	Chi-cuadrado		15,00
	gl		3
	Sig. asintótica		0,002
4	Chi-cuadrado		13,044
	gl		3
	Sig. asintótica		0,005

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: concentración (%)

Anexo 16
Matriz de consistencia

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
Efecto genotóxico <i>in vitro</i> del látex de plantas medicinales antiverrucosas <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo", Ayacucho 2013.	¿Cuál será el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del látex de las plantas medicinales antiverrucosas <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo" frente al ADN genómico de linfocitos humano?	<p>GENERAL</p> <p>Determinar el efecto genotóxico <i>in vitro</i> del látex de las plantas medicinales antiverrucosas <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo".</p> <p>ESPECIFICOS</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Identificar los metabolitos secundarios en el látex de las plantas medicinales antiverrucosas <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo". ▪ Caracterizar el efecto de la genotoxicidad del látex de las plantas medicinales antiverrucosas en estudio, con ensayos <i>in vitro</i> sobre el ADN genómico de linfocitos humano detectado mediante electroforesis. 	<p>Aspectos Botánicos de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo":</p> <p>Clasificación taxonómica, Descripción Botánica, Composición Química, Actividades Biológicas.</p> <p>ADN Genotoxicidad. Electrophoresis.</p>	El látex de las plantas medicinales antiverrucosas <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo", presentan efecto genotóxico <i>in vitro</i> sobre el ADN genómico de linfocitos humano, detectado mediante electroforesis.	<p>Variable Principal:</p> <p>Plantas medicinales antiverrucosas <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo".</p> <p>Indicador:</p> <p>- Especies de plantas medicinales antiverrucosas <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo".</p> <p>- Concentración del látex en microlitros (%).</p> <p>Variable secundaria:</p> <p>Efecto genotóxico <i>in vitro</i> de las plantas medicinales.</p> <p>Indicador:</p> <p>- ADN genómico de linfocitos humano.</p> <p>- Fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN).</p>	<p>Tipo de investigación :</p> <p>Básica – descriptivo.</p> <p>Nivel de investigación:</p> <p>Básico</p> <p>Población: Plantas de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo" ubicadas en el rango altitudinal de 2700 msnm, que crecen en los diferentes pisos ecológicos de los distritos de Ayacucho y San Juan Bautista, respectivamente, de la provincia de Huamanga de la región de Ayacucho, Perú.</p> <p>Muestra: 500 µL de látex de <i>Euphorbia peplus</i> L. "leche leche" y <i>Ficus carica</i> L. "higo".</p> <p>Diseño de Investigación:</p> <p>Los ensayos se realizarán con un modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica del látex, sobre el ADN genómico de linfocito humano, demostrándose por su fragmentación.</p> <p>Análisis estadístico:</p> <p>Los datos serán agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que expliquen mejor los hallazgos. Se aplicará la prueba de Mann Whitney y prueba de Kruskal Wallis para determinar el nivel de significancia del efecto genotóxico sobre el ADN genómico de linfocito humano. El valor de $p \leq 0,05$, se considerará como el nivel estadísticamente significativo.</p>

Efecto genotóxico *in vitro* del látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”. Ayacucho, 2013.

Lizbeth Pillaca Untiveros¹, Tomás Miranda Tomasevich¹ y Enrique Aguilar Felices¹.
¹Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

RESUMEN

Tradicionalmente algunas de las infecciones virales, principalmente las que afectan a nivel de la piel, como las verrugas, han sido tratados con productos de origen vegetal; y los estudios de genotoxicidad se orientan a evidenciar a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por los compuestos evaluados. Motivo por el que realizamos el presente estudio teniendo como objetivo determinar el efecto genotóxico “*in vitro*” del látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”. Esta investigación descriptiva, se desarrolló en los Laboratorios de Farmacognosia de la Escuela de Formación Profesional de Farmacia y Bioquímica, y el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de octubre del 2013 y marzo del 2014 en la ciudad de Ayacucho. El látex fue obtenido directamente de la planta, realizando un corte del tallo de la “leche leche” y base del fruto verde del “higo” (sicono), se realizó el tamizaje fitoquímico, y la determinación genotóxica del látex a diferentes concentraciones, expuestos sobre el ADN genómico de linfocito humano, mediante el “método Tomasevich”, cuya estimación del daño genotóxico “*in vitro*” fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra UVsolo TS y cámara digital convencional. Los metabolitos secundarios identificados en látex “leche leche” fueron: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos, flavonoides, saponinas y principios amargos y astringentes, y en látex de “higo” alcaloides, lactonas y/o cumarinas, flavonoides y principios amargos y astringentes. El látex de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” como de *Ficus carica* L. “higo” presentaron una importante actividad genotóxica sobre el ADN genómico de linfocito humano, siendo a concentraciones de 100% y 50% la mayor fragmentación del ADN con respecto a 25% y 10%. Se concluye que el látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo” presentan efecto genotóxico “*in vitro*”, que depende directamente de la concentración del látex; mas no así del tiempo de incubación.

Palabras clave: Genotoxicidad, ADN genómico de linfocitos humano, *Euphorbia peplus* L. y *Ficus carica* L.

SUMMARY

Traditionally some of the viral infections, mainly those affecting the skin level, such as warts, have been treated with products of plant origin; and genotoxicity studies are oriented to show what level of organization of the DNA damage caused by tested compounds operates. Why that performed this study aimed to determine the effect of medicinal plants latex “*in vitro*” genotoxic antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. “milk milk” and *Ficus carica* L. “fig”. This descriptive research, developed in the school of vocational training of Pharmacy and biochemistry laboratory of pharmacognosy and the Centre for research in Molecular Biology and Bioinformatics of the Faculty of biological sciences at the National University of San Cristóbal de Huamanga, during the months of October 2013 and March of 2014 in the city of Ayacucho. Latex was obtained directly from the plant, making a cut stem of “milk”milk and the fruit base ‘fig’ (the syconium) green, was screening phytochemical, and determining genotoxic latex at various concentrations, exposed on the genomic DNA of human, using the “Tomasevich method” lymphocyte, whose estimate of the “*in vitro*” genotoxic damage was determined by electrophoresis in gel agarose with ethidium bromide and visualized in ultra violet light radiation, within the recorder images Biometra UVsolo TS and conventional digital camera system. Secondary metabolites identified in latex “milk milk” were: alkaloids, lactones or coumarins, phenols and/or tannins, flavonoids, saponins and principles bitter and astringent, and in “fig” latex alkaloids, lactones or coumarins, flavonoids and bitter and astringent principles. The latex of *Euphorbia peplus* L. “milk milk” as *Ficus carica* L. “fig” presented an important activity genotoxic on genomic DNA of human lymphocyte, being at 100% and 50% concentrations the further fragmentation of the DNA from 25% to 10%. It is concluded that

medicinal plants latex antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "milk milk" and *Ficus carica* L. "fig" have genotoxic effect "in vitro", which directly depends on the concentration of latex; but not so the incubation time.

Key words: genotoxicity, genomic DNA isolation from human lymphocyte, *Euphorbia peplus* L. and *Ficus carica* L.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas que la humanidad ha enfrentado durante su existencia viene a ser las infecciones virales, tradicionalmente algunas de estas infecciones principalmente las que afectan a nivel de la piel como las verrugas, han sido tratados con productos de origen vegetal, que al mismo tiempo podrían proporcionar una alternativa de solución frente a este problema. El uso de las plantas medicinales en la terapéutica requiere, al igual que los productos sintéticos, de investigaciones previas y posteriores a su comercialización, donde sigan siendo observadas mediante estudios de farmacovigilancia.¹ Las pruebas de toxicidad se realizan con el fin de identificar posibles daños para el ser humano ya que, se han detectado que la *Euphorbia peplus* L. es uno de una serie de plantas de la familia *Euphorbiaceae* que ha atraído la atención como un remedio casero para el cáncer de piel debido a su savia lechosa. Sin embargo, una encuesta realizada por Peplin Biotech de más de 200 especies de la familia *Euphorbiaceae* ha demostrado que sólo *Euphorbia peplus* L. tiene los atributos deseados de eficacia anticancerígena *in vitro* e *in vivo*.² Mientras tanto el látex del "higo" tiene un efecto irritante sobre la piel, debido a su contenido en furocumarinas, por lo que se utiliza para ablandar y estimular los callos, durezas y verrugas.³ Los compuestos genotóxicos producen efectos que pueden manifestarse en el propio individuo o en su descendencia originando enfermedades genéticas. Tales razones justifican que las investigaciones de genotoxicidad sean tan necesarias y en este sentido se amplíen los conocimientos de las plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" respecto a los posibles efectos sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN).³ En los últimos años estas pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.¹⁰ Al látex de estas plantas se le atribuye propiedades antimicótica, anticancerígena, purgante en pocas gotas, como bactericida, para extirpar verrugas, como cicatrizante de heridas, como antiséptico, etc, las mismas que fueron demostradas por trabajos de investigación. Se emplea un sistema de ensayo a corto plazo *in vitro* utilizando el ADN genómico de

linfocito humano como organismo para detectar daño genético.

Como parte del estudio farmacológico y toxicológico de estas plantas, en el presente trabajo se pretende desarrollar los siguientes objetivos:

Objetivo General:

- Determinar el efecto genotóxico *in vitro* de las plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo".

Objetivos Específicos:

- Identificar los metabolitos secundarios en el látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo".
- Caracterizar el efecto de la genotoxicidad del látex de las plantas medicinales antiverrucosas en estudio, con ensayos *in vitro* sobre el ADN genómico de linfocitos humano, detectado mediante electroforesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN Y MUESTRA

Población

Plantas de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" ubicadas en el rango altitudinal de 2700 msnm, que crecen en los diferentes pisos ecológicos de los distritos de Ayacucho y San Juan Bautista, respectivamente, de la provincia de Huamanga de la región de Ayacucho, Perú.

Muestra

- 500 µL de látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche".
- 500 µL de látex de *Ficus carica* L. "higo".

Tipo de muestreo

Muestreo por conveniencia.

Unidad muestral

Látex de las plantas medicinales en estudio.

DISEÑO METODOLÓGICO

Metodología para la recolección de datos

Recolección de la muestra

Las muestras de la *Euphorbia peplus* L. "leche leche" fueron recolectadas en los jardines de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga del distrito de Ayacucho; y las muestras de la *Ficus carica* L. "higo" recolectados de la huerta de un domicilio del distrito de San Juan Bautista, provincia de Huamanga, de la región de Ayacucho. Todas ellas en buen estado de conservación, recogidas en las

primeras horas del día, e inmediatamente fueron transportadas a los laboratorios para los ensayos respectivos.

Para la identificación taxonómica de cada planta medicinal en estudio, se emplearon muestras con hojas, tallos y flores en cuanto a la "leche leche"; mientras para el "higo" hojas, flores y frutos, que fueron realizadas en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas por la Blga. Laura Aucasime Medina.

Obtención del látex:

El látex de "leche leche" se obtuvo realizando cortes en los tallos verdes, para dejar caer el látex en tubos eppendorf estériles de 2 mL; para el caso del "higo" se realizó un corte en la base del fruto verde (sicono), para dejar caer el látex en tubos eppendorf estériles de 2 mL.

Tamizaje fitoquímico

Se realizó una marcha fitoquímica al látex obtenidos de las plantas medicinales en estudio, para determinar la presencia de los diferentes metabolitos secundarios siguiendo el procedimiento de Lock de Ugaz, Miranda y Cuellar.^{4,5}

Extracción de ADN genómico de *linfocitos humano*:

Se realizó a partir de una unidad de bolsa colectora de sangre "cuádruple" fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos, para descartar, que se consiguió en donación del Banco de Sangre del Tabla 1. Preparación de las soluciones para la prueba de genotoxicidad "in vitro" de ADN genómico, por efecto del látex de plantas medicinales.

Hospital Regional de Ayacucho "Miguel Ángel Mariscal Llerena", y obtener el ADN genómico mediante extracción orgánica, modificado por Miranda.⁶

Cuantificación de ADN genómico de *linfocitos humano*:

- Por espectrofotometría ultra violeta.
- Por electroforesis.

Ensayos de la genotoxicidad *in vitro*:

Se desarrolló siguiendo el "método Tomasevich" propuesto por Miranda⁶; con las siguientes fases:

• Fase I: Cuantificación y preparación de Stock de ADN genómico de *linfocitos humano*.

El ADN genómico de *linfocitos humano* obtenido, fue cuantificado por espectrofotometría UV marca Eppendorf BioPhotometer plus; luego se preparó un stock a concentración de 1500 ng/ μ L en volumen final de 150 μ L, para cada planta medicinal en estudio.

• Fase II: Prueba de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico de *linfocitos humano*.

Se preparó las soluciones del látex de cada planta medicinal, a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%, con agua bidestilada estéril.

Se acondicionó las soluciones de genotoxicidad "in vitro" de ADN genómico, de acuerdo al detalle siguiente:

CONDICIONES		SOLUCIONES PARA PRUEBA DE GENOTOXICIDAD "in vitro"								
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Stock de ADN (1 500 ng/ μ L)		14	14	14	14	14	14	14	14	14
Volumen en μ L		14	14	14	14	14	14	14	14	14
Látex	Concentración (%)	100	50	25	10	100	50	25	10	-
	Volumen (μ L)	6	3	1,5	0,6	6	3	1,5	0,6	-
Agua bidestilada estéril		-	3	4,5	5,4	-	3	4,5	5,4	6
Volumen total (μ L)		20	20	20	20	20	20	20	20	20
Incubación a 37°C (h)			1				4			-

Se realizaron cuatro repeticiones de las pruebas de genotoxicidad “*in vitro*”, de cada planta medicinal en estudio.

• **Fase III: Electroforesis para la detección de genotoxicidad.**

Se preparó el gel de agarosa al 1% y se dispuso de una cámara de electroforesis Biometra.

Para el volumen de carga en gel de agarosa, de los productos de la reacción de genotoxicidad, se utilizó las siguientes cantidades: 1 µL de loading (colorante señalizador de migración de las bandas), 4 µL de la solución para la prueba de genotoxicidad “*in vitro*” y 2 µL de agua bidestilada estéril, volumen final 7 µL; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.

Adicionalmente se preparó el ladder 100 pb (marcador de tamaño molecular de 100 pb) con: 1 µL de loading, 4 µL de ladder y 2 µL de agua bidestilada estéril, volumen final 7 µL; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.

Se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se corrió a 30 voltios (V) por 5 horas.

• **Fase IV: Radiación UV para la visualización de genotoxicidad.**

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergirá el gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos aproximadamente, se enjuagó con abundante agua corriente dos veces y se hizo la lectura por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS, adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; para visualizar los fragmentos del ADN producto de la digestión.

• **Fase V: 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 Poma.⁷

Tabla 2. Valoración numérica de la genotoxicidad.

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., 2007

Análisis de datos

Los datos fueron agrupados y presentados en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizó la prueba de Mann-Whitney de comparación de máximos y mínimos para dos muestras independientes y Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de $p \leq 0,05$, se consideró como el nivel estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Tabla 3. Metabolitos secundarios en el látex de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo”.

Metabolitos secundarios	Resultados	
	Leche leche	Higo
Alcaloides	+++	+++
Lactonas y/o cumarinas	+	++
Fenoles y/o taninos	++	-
Flavonoides	+++	++
Saponinas	++	-
Principio amargo y astringente	+++	+++

Leyenda: Leve (+), Moderada (++), Abundante (+++)



Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/μL, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%, durante 1 y 4 horas de incubación a 37°C. Ayacucho, 2013.

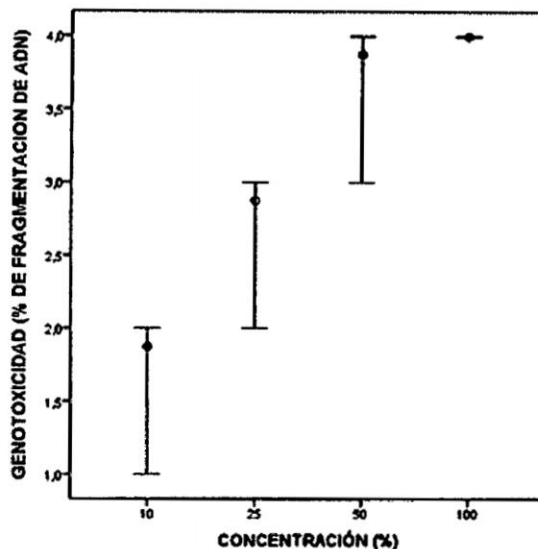


Figura 3. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones, durante 4 horas de incubación a 37°C.

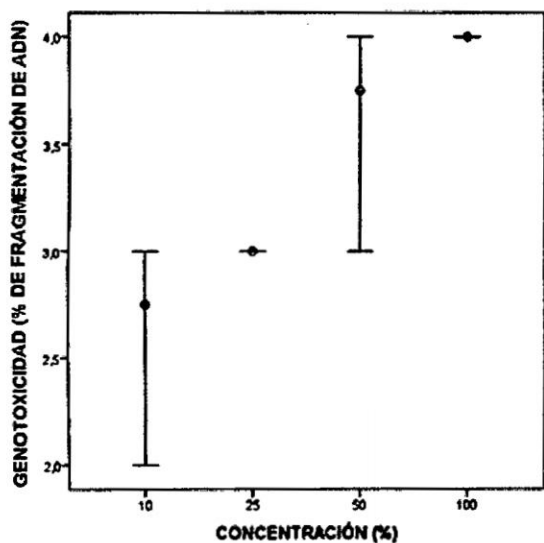


Figura 2. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a diferentes concentraciones, durante 1 hora de incubación a 37°C.

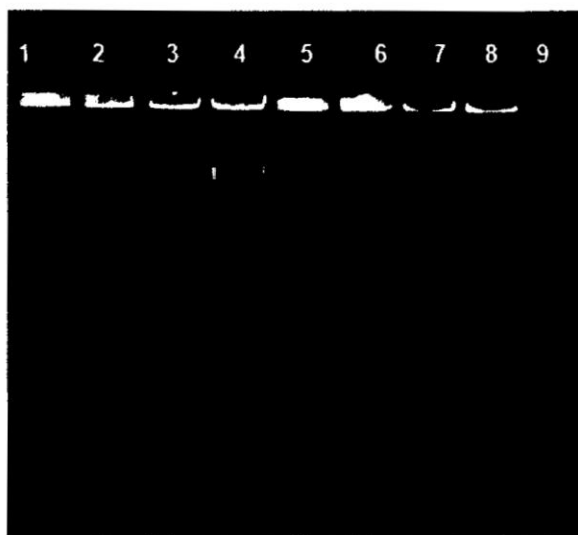


Figura N° 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad del ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/μL, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% durante 1 y 4 horas a 37°C.

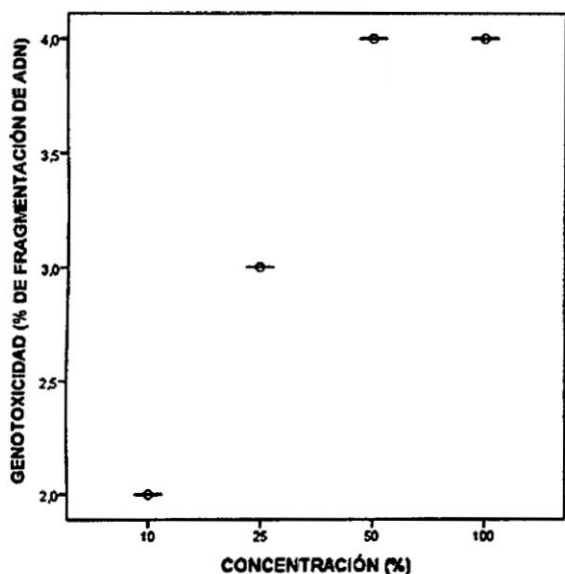


Figura 5. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones, durante 1 hora de incubación a 37°C.

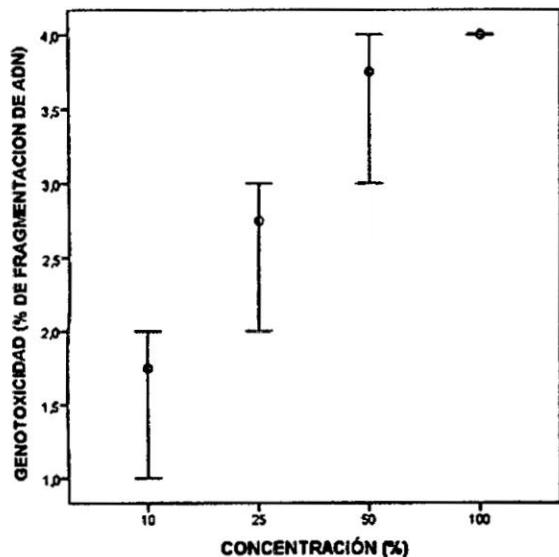


Figura 6. Variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones, durante 4 horas de incubación a 37°C.

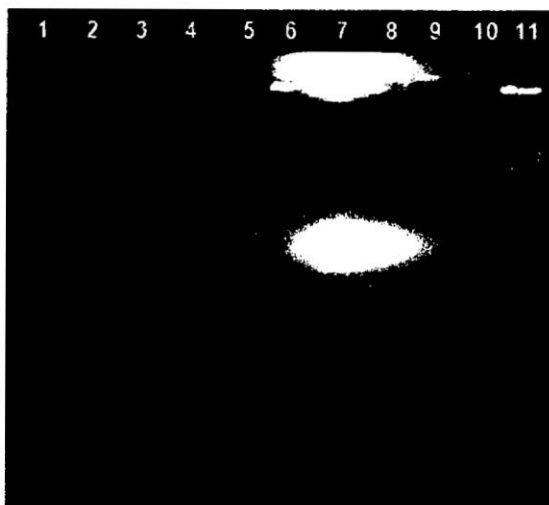


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de la genotoxicidad de ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/μL, como prueba control con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10%.

DISCUSIÓN

La evaluación genotóxica de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos "in vitro" si es que resultara negativo se prosigue con el ensayo "in vivo", para demostrar el daño a nivel del ADN.⁸

Por ello en el presente trabajo de investigación de desarrollo la actividad genotóxica in vitro a las plantas medicinales *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" por medio de electroforesis en gel. Como primera instancia se realizó el tamizaje fitoquímico del látex de la *Euphorbia peplus* L. "leche leche" desarrollado según la técnica de Lock⁴ y Miranda⁵ en el cual se reporta la presencia de los metabolitos secundarios como: alcaloides, lactonas y/o cumarinas, fenoles y/o taninos y flavonoides; además se identificó la presencia de saponinas, principios amargos y astringentes (Tabla 3), lo cual coincide con un reporte anterior.⁹

Mientras que en el látex de *Ficus carica* L. "higo", se encontraron tales como: alcaloides, lactonas y/o cumarinas y flavonoides; además de principios amargos y astringentes. Estudios realizados nos confirma la presencia de estos metabolitos encontrados.¹⁰

El registro fotográfico de la figura 1, revela muy claramente la fragmentación del ADN de linfocitos humano a 1500 ng/μL, por el efecto genotóxico de látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" a

diferentes concentraciones porcentuales, el carril 1 (100%), carril 2 (50%), carril 3 (25%) y carril 4 (10%) incubados a 37°C por 1 hora; carril 5 (100%), carril 6 (50%), carril 7 (25%) y carril 8 (10%) incubados a 37°C por 4 horas, el carril 9 con ADN de linfocito humano a concentración de 1500 ng/μL como control. Podemos visualizar que el látex al 100% en el carril 1, ha degradado el ADN a fragmentos pequeños menores de 300 pb comparando con el recorrido del loading correspondiente al azul de bromofenol, mostrando una masa compacta de tamaño homogéneo con refringencia de color naranja e intensa por su alta concentración; el carril 2 muestra similar genotoxicidad, pero con fragmentos ligeramente más grandes que las del carril 1, el carril 3 muestra el efecto genotóxico con fragmentos de ADN de tamaño diverso y dispersos en la trayectoria del carril a razón de su tamaño de aproximadamente 300 pb hasta 10 000 pb (de abajo hacia arriba), y en el carril 4, con efecto parecido al anterior, pero con rango de fragmentos mayores a 10 000 pb. El carril 5, respecto al carril 1, revela un mayor efecto genotóxico a punto de desintegrar la totalidad de ADN, por el tiempo de incubación de 4 horas, mientras que los carriles 6, 7 y 8 son similares a los carriles 2, 3 y 4. El carril 9 de control, nos sirve para comparar los recorridos electroforéticos a razón del tamaño de las moléculas de ADN, pues ella ha recorrido poco espacio y por su alta concentración, parte de ella ha quedado atrapado en el pozo del gel. Según los estudios de Eijchart A, 2003.,¹² los parámetros validados para determinar el daño evaluado mediante el ensayo cometa fueron: migración del ADN, concentración de ADN en la cola, momento de cola, y momento Olive, entre otros. En este estudio se utilizó como parámetro de medida la longitud de cola (μm); de acuerdo con este valor, se clasificó arbitrariamente, el tipo de daño en cinco categorías: 0, células sin daño (0-18 μm); 1, células con daño bajo (19-37 μm); 2, células con daño medio (38-56 μm); 3, células con daño alto (57-75 μm) y 4, células con daño total (mayor de 75 μm). Otro parámetro que se tuvo en cuenta para los análisis de genotoxicidad, fue la frecuencia de células dañadas en cada tratamiento.

La figura 2, muestra la variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta (p=0.008), por lo tanto la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico.

La figura 3, muestra la variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos

humano, con látex de *Euphorbia peplus* L. “leche leche” a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta (p=0.014), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico.

Estos resultados, lo podemos corroborar en el estudio de Reynoso, 2011,¹³ menciona que la genotoxicidad depende de la concentración del extracto. No existen reportes previos acerca de este comportamiento, pero es sabido que las dosis elevadas de cualquier genotóxico inducen un alto nivel de ruptura en el ADN, lo cual, puede ocasionar la aparición de caudas sumamente largas (y por lo tanto no perceptibles al microscopio), lo que conduce a una cuantificación a la baja de caudas. Concentraciones menores ocasionan daño genético no tan severo produciendo caudas más visibles y, aparentemente más largas; explicaciones de esta aparente paradoja, lo reportan diferentes estudios de ensayos de electroforesis de una sola célula “ensayo cometa”.

En el registro fotográfico de la figura 4, de electroforesis en gel de agarosa al 1%, revela la actividad de genotoxicidad representado por la fragmentación del ADN de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, inducida por el látex de *Ficus carica* L. “higo” a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% incubados a 37°C; los carriles 1 y 2 muestran una actividad mayor a 95%, los carriles 3 de 40 a 95% y el carril 4 de 20 a 40%, durante 1 hora de incubación. Durante 4 horas de incubación, los carriles 5 y 6 mayor a 95%, los carriles 7 y 8 entre 20 a 40% de fragmentación; se puede apreciar que gradualmente se forma las “colas” del corrido de fragmentos de ADN en cada carril, cada vez más larga que las anteriores; el carril 9 muestra el espacio recorrido del ADN control a 1 500 ng/μL, que nos permite comparar con los productos fragmentados. Nótese que las refringencias que emanan de los pozos del gel en los carriles 1, 2, 5 y 6, no son de color naranja que indicaría presencia de ADN, por el contrario son de color blanco que corresponde a restos del látex de la planta en estudio.

Estos productos fragmentados de ADN lo contrastamos según un estudio realizado por Ortiz I. et al, 2012.,¹⁴ quienes evaluaron la genotoxicidad por medio del ensayo cometa alcalino que se basa en que los daños en el ADN nuclear generados por un agente genotóxico que no causa ligamientos cruzados, produce fragmentos de ADN de bajo peso molecular, generados por rupturas directas de cadena doble o sencilla, o indirectamente, por reparación por escisión incompleta o por la formación de sitios lábiles al álcali. Estos

fragmentos de ADN se liberan durante el período de desnaturalización alcalina y generan la cola del cometa durante la electroforesis. El ADN de alto peso molecular no migra y forma la cabeza del cometa. Así, mientras mayor sea el daño y la fragmentación generados por el compuesto genotóxico, mayor será la longitud de la cola del cometa.

La figura 5, muestra la variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C, que resulta ($p=0.002$), por lo tanto la concentración es muy influyente en el efecto genotóxico.

La figura 6, muestra la variación del porcentaje de fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, con látex de *Ficus carica* L. "higo" a diferentes concentraciones, durante cuatro horas de incubación a 37°C, que resulta ($p=0.005$), por tanto las concentraciones influyen directamente en el efecto genotóxico.

Mediante el estudio de Villalba, 2013,¹¹ Las furocumarinas cumplen con la función de incluirse en la formación de entrecruzamientos entre las hebras del DNA, que tienen el inconveniente de no poder ser reparados con facilidad por los mecanismos de reparación del material genético, resultando ser mutagénicos y carcinogénicos; motivo por el cual explicaría nuestros resultados obtenidos.

El registro fotográfico de la figura 7, nos permite visualizar la actividad genotóxica de ADN genómico de linfocitos humano a 1500 ng/ μ l, con látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" a concentraciones de 100%, en los carriles 1 y 6 respectivamente, la genotoxicidad de "leche leche" presenta fragmentos de ADN de aproximadamente 100 a 500 pb, mientras que con el "higo" el ADN fue totalmente fragmentado y obsérvese que la refringencia del pozo correspondiente no es de color naranja, sino blanquecino que correspondería a restos del látex; ambos comparados con el carril 11 que muestra el ADN control a 1500 ng/ μ L. Los carriles 2, 3, 4 y 5 corresponden al látex de "leche leche" a concentraciones de 100%, 50%, 25% y 10% respectivamente, las mismas que sirven de control para certificar la ausencia de ADN en el látex, lo mismo que los carriles 7, 8, 9 y 10 para el látex del "higo". Nos permitimos comentar la diferencia visual que percibimos entre los carriles de ambos látex, con presencia de sustancias refringentes en el caso del "higo" que estaría evidenciando la diferencia en los componentes de ambos látex.

Se concluye que el látex de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L. "higo" presentan efecto genotóxico "in vitro", que depende directamente de la concentración del látex; mas no así del tiempo de incubación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García A, Ávila Y, Alonso L, López P, Ruiz A, & Morón F, Et al. Reacciones adversas reportadas por consumo de productos naturales en Cuba durante 2003 y 2007. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14, 1-11.2009.
2. Craig D, Parsons P. *Euphorbia peplus* una planta con posibles propiedades anticancerígenas. Wildcrafted Herbal Products [revista en internet]. 2002 enero. [acceso 27 de febrero del 2014]; 10(2). Disponible en: [http://www.wildcrafted.com.au/Articles/Scientific Research/Milkweed for skin cancer.html](http://www.wildcrafted.com.au/Articles/Scientific%20Research/Milkweed%20for%20skin%20cancer.html)
3. Chacua A, "Determinación del proceso tecnológico para la obtención de harina de higo (*Ficus carica* L.) de dos estados de madurez (verde y negra)". [Tesis para optar título]. Universidad Técnica del Norte. Ibarra – Ecuador. 2010
4. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los productos naturales. 2ª ed. Lima: Fondo editorial; 1994.
5. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales. Universidad De La Habana Instituto de Farmacia y Alimentos. Cuba; 2000.
6. Miranda T, Valer G. Protocolos de Biología Molecular-Guía de práctica. Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2013.
7. Larrea Poma M. Evaluación del daño genotóxico por exposición a plaguicidas en agricultores del municipio de Luribay [tesis de grado]. La Paz. Universidad Mayor de San Andrés; 2007.
8. Jakupovic J, Morgernstern T, Bittner M y Silva M. " Diterpenes from *Euphorbia peplus*". *Phytochemistry* 1601 – 1609. 1998.
9. Vega R. Efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L. "leche leche" y *Ficus carica* L."higo" en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. "cebolla". [Tesis para optar título]. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú. 2006.
10. Clayson B. y Grant L. The assessment of mutagenicity. Health protection branch

- mutagenicity guidelines. *Environmental and Molecular Mutagenesis*: Vol. 21:15-37. 1992.
11. Villalba C. Elaboración y control de calidad de un gel astringente a base de *costus spicatus*, *ficus carica*, *salvia officinalis*". [Tesis de grado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Farmacia y Bioquímica. Riobamba-Ecuador. 2013
 12. Ejchart A, Sadlej-Sosnowska N. Statistical. Evaluation and comparison of comet assay results. *Mutat Res.* [revista en internet]. 2003. [acceso 27 de marzo del 2014]; 13(5). Disponible en:
[http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00250-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00250-4).
 13. Reynoso M. Evaluación de la genotoxicidad de compuestos aislados de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco. Mexico.2011.
 14. Ortiz I, Peláez C, Orozco L & Zuleta M. Interacciones genotóxicas de mutágenos en mezclas binarias mediante ensayo cometa alcalino en linfocitos humanos. Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 2012.