

T
615.321
P59

NO SALE A
DOMICILIO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA
AMAZONÍA PERUANA



FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

“Evaluación genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*,
Uncaria guianensis y *Uncaria tomentosa* en linfocitos de ratas albinas cepa
Holtzmann”

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Presentado por:

Bach. F.BQ. Pinedo Torres, Jorge.



Asesor:

Blgo. Ríos Isern, Felipe.



100

Coasesores:

Blgo. Castro Gómez, Juan Carlos.

Q.F. Nina Chora, Ernesto Anselmo.

IQUITOS - PERU

2010

DONADO POR:
Bach. F.B.Q. Pinedo Torres, Jorge
Iquitos, 25 de 10 de 2010



"Año de la Consolidación Económica y Social del Perú"

ACTA DE SUSTENTACION

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los 09 días del mes de Marzo del dos mil diez, siendo las 10:30 horas, el Jurado de Tesis designado según Resolución de Coordinación N° 090-FFB-UNAP-2009, integrado por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Q.F. Carlos Enrique Calloapaza Valladares Presidente
Q.F. Patricia Utia Torrejón Miembro
Q.F. Jhon Paul Castañeda Videira Miembro

Se constituyeron en las instalaciones del Laboratorio N° 4 de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis Titulada "Evaluación genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de Gentianella alborosea, Uncaria guianensis y Uncaria tomentosa en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann" presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica Jorge Pinedo Torres, para optar el TITULO PROFESIONAL DE QUIMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición del sustentante y habiéndose formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas:

Satisfactoriamente

El jurado llegó a la siguiente conclusión:

- 1.- La Tesis ha sido Aprobada por Unanimidad
2.- Observaciones Ninguna

Siendo las 11:15 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándole al sustentante por su Buena Exposición

Signature of Carlos Enrique Calloapaza Valladares
Q.F. Carlos Enrique Calloapaza Valladares
Presidente

Signature of Patricia Utia Torrejón
Q.F. Patricia Utia Torrejón
Miembro

Signature of Jhon Paul Castañeda Videira
Q.F. Jhon Paul Castañeda Videira
Miembro

**“Evaluación genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*,
Uncaria guianensis y *Uncaria tomentosa* en linfocitos de ratas albinas cepa
Holtzmann”**

RESUMEN

Se evaluó el potencial genotóxico de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann; la administración por vía oral de los extractos fue durante 5 días. La técnica empleada fue el Ensayo Cometa, siendo los parámetros de medición del daño al ADN: las Unidades Arbitrarias, Momento de la Cola Olive y Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas. Se utilizó como controles positivos: el Peróxido de Hidrógeno al 1% y Ciclofosfamida 50 mg/Kg.; el control negativo fue solución salina de Cloruro de sodio 0.9%.

Los resultados indican que hubo un aumento en los valores de unidades arbitrarias y momento de la cola olive; sin embargo este aumento no indica un potencial genotóxico de estas especies. También hubo una disminución de los valores del porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas. Se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$).

De los extractos en estudio, el extracto con posible potencial genotóxico fue *Uncaria guianensis*. Se concluye que los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* no son genotóxicos en los linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann.

Palabras claves: *Gentianella alborosea*; *Uncaria guianensis*; *Uncaria tomentosa*; Ensayo cometa; Genotoxicidad.

“Genotoxic evaluation of the liophilized aqueous extracts of *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* and *Uncaria tomentosa* in lymphocytes of Holtzmann albino rats”

ABSTRACT

It's was evaluated the genotoxic potencial of the liophilized aqueous extracts of *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* and *Uncaria tomentosa* at doses of 1000 and 2000 mg/Kg. for five consecutive days in lymphocytes of Holtzmann albino rats. The employed technique was the Comet Assay, being the measurement parameters of DNA damage: the Arbitrary Units, Olive Tail Moment and DNA percentage in the head.

The positives controls were: Hydrogen Peroxide at 1% and Cyclophosphamide 50 mg/Kg.; the negative control was saline solution 0.9%.

The results indicate that there was an increase in the values of de arbitrary units and olive tail moment, however this increase don't indicate a genotoxic potencial of this species. Also there was a decrease of the values of DNA percentage in comets's head. Significant statistical differences were observed ($p<0.05$).

From the extracts in study, the extract with a possible genotoxic potencial was *Uncaria guianensis*. In conclusion, the freeze-dried aqueous extracts of *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* and *Uncaria tomentosa* aren't genotoxics in lymphocytes of Holtzmann albino rats.

Key words: *Gentianella alborosea*; *Uncaria guianensis*; *Uncaria tomentosa*; Comet assay; Genotoxicity.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi Dios, Jehová; por enseñarme a hacer posible lo imposible.

“Todo lo puedo en Cristo que me fortalece. Filipenses 4: 13”

A mi papá, Jorge Ricardo; quien nunca me negó algo en mis estudios y siempre estuvo guiándome con sus consejos en mi vida personal. A mi mamá, Elvira; porque siempre estuvo a mi lado, apoyándome en todo al igual que mi papá. Sin ellos esto no hubiera sido posible, que yo culmine mis estudios universitarios y elabore este trabajo de investigación.

A mis hermanos, Julio, Arnold y Pamela; a ustedes: porque también colaboraron mucho en todos estos años. Gracias por existir y enseñarme el verdadero significado de una familia.

A mi tío, Juan; quien me apoyó en los momentos difíciles. Tú estuviste allí, gracias tío.

A mis abuelitos, Jorge (Q.E.P.D.) e Isabel; Walter y Luzvina. Ustedes fueron la inspiración de todo para mí y gracias por los padres maravillosos que me dieron, fruto de la crianza que les dieron; es que me formaron en un hombre de bien.

A Tula Mercedes, por estar siempre a mi lado y comprenderme siempre. Por darme ese espacio que uno necesita para poder dedicarse a los estudios.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial para aquellas personas que colaboraron en la ejecución de este trabajo.

A los investigadores del Instituto de Medicina Tradicional – EsSalud, Red Asistencial Loreto: Blgo. Felipe Ríos Isern, Q.F. Ernesto Anselmo Nina Chora. Por compartir todas sus experiencias y darme las facilidades para la ejecución de este trabajo.

A los investigadores del Laboratorio de Investigación de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana: Dr. Jorge Marapara Del Águila, Blgo. Jorge Angulo Quintanilla, Blgo. Juan Carlos Castro Gómez. Por permitir mi ingreso a dicho laboratorio y darme todas las facilidades para la realización del presente trabajo de investigación.

A: Diany Verónica Macedo Machoa, Sara Angélica Magallanes Flores, Henry Francisco Cachique Reátegui y Cesar Rodríguez Córdova; y al Q.F. Armando Cruz Flores.

A todos, muchas gracias por su ayuda incondicional; porque la investigación no es cuestión de una sola persona, sino de todo un equipo. Ustedes fueron ese equipo el cual hizo posible la realización de este proyecto.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE ABREVIATURAS	11
CAPÍTULO I	13
I. INTRODUCCIÓN	14
II. OBJETIVOS	17
CAPÍTULO II	18
I. MARCO TEÓRICO	19
II. HIPOTESIS	39
III. DEFINICIONES OPERACIONALES	40
CAPÍTULO III	45
I. METODOLOGÍA	46
CAPÍTULO IV	66
I. RESULTADOS	67
II. DISCUSIÓN	81
III. CONCLUSIONES	85
IV. RECOMENDACIONES	86
CAPÍTULO V	87
I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
II. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	98
III. ANEXOS	101

INDICE DE TABLAS

	Pág.	
Tabla N° 01	Valores de Unidades arbitrarias en ratas albinas machos. (UA)	69
Tabla N° 02	Valores de Unidades arbitrarias en ratas albinas hembras. (UA)	71
Tabla N° 03	Valores del Momento de la Cola Olive en ratas albinas machos. (MCO)	73
Tabla N° 04	Valores del Momento de la Cola Olive en ratas albinas hembras. (MCO)	75
Tabla N° 05	Valores del porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas machos. (% ADN cabeza)	77
Tabla N° 06	Valores del porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas hembras. (% ADN cabeza)	79

INDICE DE GRÁFICOS

		Pág.
Gráfico N° 01	Variaciones del peso corporal en ratas albinas machos. (g)	68
Gráfico N° 02	Variaciones del peso corporal en ratas albinas hembras. (g)	68
Gráfico N° 03	Variaciones de las Unidades Arbitrarias en ratas albinas machos. (UA)	70
Gráfico N° 04	Variaciones de las Unidades arbitrarias en ratas albinas hembras. (UA)	72
Gráfico N° 05	Variaciones del Momento de la Cola olive en ratas albinas machos. (MCO)	74
Gráfico N° 06	Variaciones del Momento de la Cola Olive en ratas albinas hembras. (MCO)	76
Gráfico N° 07	Variaciones del porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas machos. (% ADN cabeza)	78
Gráfico N° 08	Variaciones del porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas hembras. (% ADN cabeza)	80

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo N° 01 Certificado de salud de los animales de experimentación emitido por el Instituto Nacional de Salud	102
Anexo N° 02 Certificado de <i>Herbarium Amazonense</i> emitido por la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana	103
Anexo N° 03 Flujograma para la evaluación genotóxica de los extractos por el Ensayo Cometa	104
Anexo N° 04 Tabla de dosificación	105
Anexo N° 05 Fórmulas para calcular la cantidad de soluto y solvente para la preparación de los extractos acuosos liofilizados	106
Anexo N° 06 Ficha de recolección de datos: Marcaje y pesado de los animales	107
Anexo N° 07 Criterios de clasificación de los cometas mediante el método visual	107
Anexo N° 08 Ficha para la recolección de datos: Evaluación genotóxica – Unidades Arbitrarias	108
Anexo N° 09 Peso corporal de ratas albinas machos. (g)	108
Anexo N° 10 Peso corporal de ratas albinas hembras. (g)	109
Anexo N° 11 Promedios de la lectura por el método visual: Unidades Arbitrarias en ratas albinas machos.	110
Anexo N° 12 Promedios de la lectura por el método visual: Unidades Arbitrarias en ratas albinas hembras.	110
Anexo N° 13 Promedios del análisis por el software Comet Score v. 1.5: Momento de la Cola Olive en ratas albinas machos.	111
Anexo N° 14 Promedios del análisis por el software Comet Score v. 1.5: Momento de la Cola Olive en ratas albinas hembras.	111
Anexo N° 15 Promedios del análisis por el software Comet Score v. 1.5: Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas machos.	112
Anexo N° 16 Promedios del análisis por el software Comet Score v. 1.5: Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas machos.	112

INDICE DE FOTOS

	Pág.
Foto N° 01 Administración de la sustancia por vía oral a ratas albinas cepa Holtzmann	113
Foto N° 02 Toma de muestra sanguínea por punción cardíaca	113
Foto N° 03 Muestra de sangre obtenida por punción cardíaca en un microtubo conteniendo anticoagulante	113
Foto N° 04 Muestra de sangre (capa superior) y Ficoll (capa inferior)	114
Foto N° 05 Producto después de la centrifugación, se observa un halo en la capa media	114
Foto N° 06 Preparación de las láminas con los geles de agarosa conteniendo los linfocitos para ser sometidos a lisis	114
Foto N° 07 Proceso de electroforesis	115
Foto N° 08 Neutralización de los geles en el agitador horizontal	115
Foto N° 09 Geles teñidos con las soluciones A y B	115
Foto N° 10 Agregado de la solución de detención de tinción sobre los geles teñidos	116
Foto N° 11 Producto final, geles en etapa de secado	116

LISTA DE ABREVIATURAS

♂	Macho.
♀	Hembra.
%	Porcentaje.
°C	Grados Celsius.
Σ	Sumatoria.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
a.m.	Antes del medio día.
ARN	Ácido ribonucleico.
cm.	Centímetro.
CTA	Clases tóxicas agudas.
DL ₅₀	Dosis letal media.
mg/Kg.	Miligramo/Kilogramo.
g	Gramo.
g/Kg.	Gramo/Kilogramo.
ml.	Mililitro.
mm.	Milímetro.
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar.
NaCl	Cloruro de sodio.
p.c.	Peso corporal.
p.m.	Después del medio día.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.

**“Evaluación genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*,
Uncaria guianensis y *Uncaria tomentosa* en linfocitos de ratas albinas cepa
Holtzmann”**

CAPÍTULO I

I. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional está presente en todas las culturas del mundo. Como medicina tradicional se quiere decir: el conjunto de todos los conocimientos y prácticas usados en la prevención, diagnóstico y eliminación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, y confiado exclusivamente en experiencia práctica y observación, y transmitido de generación a generación en forma oral o escrita. ⁽¹⁾ El uso de las plantas en la medicina tradicional como fuente primaria de medicamentos es una práctica milenaria que mantiene su vigencia hasta estos días, y cada vez se adicionan nuevas especies al arsenal de plantas con propiedades terapéuticas demostradas por la ciencia. ⁽²⁾

El Perú es un país con una diversidad de flora única en el mundo, la misma que está representada por más de 25,000 especies de plantas, de las cuales cerca de 1,400 especies tienen propiedades curativas. Debido a sus cualidades medicinales, estas plantas se han convertido en el principal insumo de la industria farmacológica a nivel mundial, y esa es una ventaja que nuestro país debe saber aprovechar. ⁽³⁾ La ciudad de Iquitos, conocida por muchos como la capital de la Amazonía Peruana, es el lugar donde se comercializa en grandes volúmenes una gran variedad de especies amazónicas de uso medicinal. ⁽⁴⁾

Actualmente, es muy utilizado con fines medicinales la planta entera de *Gentianella alborosea* “Hercampuri” como colagogo, colerético, hipocolesterolémico y diurético ⁽⁵⁾; *Uncaria guianensis* “Uña de gato o gavián” para inflamaciones dérmicas y de las vías urinarias, asma y gastritis; y *Uncaria tomentosa* “Uña de gato” en el tratamiento de amigdalitis, artritis, artrosis, asma, diversos tipos de cáncer, inflamaciones en general. ⁽⁶⁾

Los extractos de las plantas superiores constituyen mezclas complejas que contienen un gran número de sustancias con propiedades genotóxicas ⁽⁷⁾, y su uso constante ha sido correlacionado con la ocurrencia de enfermedades en las poblaciones, de ahí el peligro potencial que encierra el consumo indiscriminado de fármacos de origen vegetal, debido a los escasos datos que se poseen sobre la acción mutagénica de las plantas medicinales consumidas por la población ⁽⁸⁾.

Ningún ensayo por sí sólo es capaz de detectar todos los agentes genotóxicos, por tanto el procedimiento usual es ejecutar una batería de pruebas estándares *in vitro* e *in vivo* para demostrar el potencial genotóxico de los mismos. ⁽⁹⁾ Los ensayos con células de mamíferos han desempeñado un papel importante en la determinación del potencial mutagénico de los agentes químicos y físicos que rodean al hombre. ⁽¹⁰⁾ Por tal motivo, los linfocitos de sangre periférica se emplean como células centinelas ideales para identificar las aberraciones cromosómicas provocadas por agentes químicos o físicos. ⁽¹¹⁾

La electroforesis de células individuales o ensayo cometa es una prueba rápida, de bajo costo. Este ensayo puede ser aplicado a cualquier célula eucariótica y permite el análisis del daño genético al nivel de células individuales. Además, se utiliza para monitoreo ambiental y análisis de sensibilidad a radiaciones. Puede aplicarse en las más disímiles circunstancias, lo que lo hace elegible para estudios de campo. ⁽¹²⁾

Existen diversos estudios de toxicología experimental realizados con estas plantas medicinales, tanto de toxicidad aguda, toxicidad crónica y genotóxica, pero hasta la fecha no se estudiaron su potencial genotóxico sobre los linfocitos. Por tal motivo es necesario la evaluación genotóxica de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* sobre los linfocitos de ratas albinas; con la finalidad de aportar datos científicos que validen su potencial genotóxico sobre el sistema inmunológico.

FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

¿Serán los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* genotóxicos a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., en los linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann?

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar y comparar el potencial genotóxico mediante el ensayo cometa, de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann.

2.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto genotóxico de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., mediante el método visual del ensayo cometa en los linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann.
2. Determinar la genotoxicidad midiendo el momento de la cola olive de los cometas en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann, producidos por los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg.
3. Determinar el porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann., administrados con los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg.
4. Comparar el efecto genotóxico entre los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., administrados a ratas albinas cepa Holtzmann.

CAPÍTULO II

I. MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

La búsqueda de información bibliográfica acerca de los estudios preclínicos y clínicos de éstas tres plantas medicinales han reportado los siguientes estudios: fitoquímicos, farmacológicos y toxicológicos.

1.1.1 *Gentianella alborosea* (Gilg) Fabris “Hercampuri”

1.1.1.1 Estudios fitoquímicos:

Kawahara *et al.* (2000); aislaron e identificaron por espectroscopía la alborosina, un sesquiterpenoide de *Gentianella alborosea*.⁽¹³⁾

Castro *et al.* (2002); investigaron la presencia de metabolitos secundarios en *Gentianella alborosea* y encontraron alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas; y glicósidos.⁽¹⁴⁾

Acero *et al.* (2006); realizaron un estudio del extracto metanólico de *Gentianella alborosea* para evaluar la captación de radicales libres por el método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo), y la inducción de apoptosis en líneas celulares de tumor uterino. Sus resultados mostraron una notable captación de los radicales libres y el efecto apoptótico fue dosis dependiente.⁽¹⁵⁾

1.1.1.2 Estudios farmacológicos:

Llanos & Llamoca (1995); demostraron la actividad hipocolesterolémica del decocto de *Gentianella alborosea* a dosis de 77 y 134 mg/Kg. p.c. en conejos, frente a un grupo control de Colestipol a dosis de 286 mg/Kg. Concluyeron que *Gentianella alborosea* ejerce un efecto hipocolesterolémico semejante al Colestipol, reduciendo los niveles de colesterol y LDL e incrementa ligeramente las HDL y VLDL.⁽¹⁶⁾

Cortijo & Rodríguez (1998); determinaron que la infusión de *Gentianella alborosea* a dosis de 150 y 300 mg/Kg., de extracto seco ejerce un efecto diurético semejante a la Hidroclorotiazida a dosis de 2 mg/Kg., pero fue menor al producido por Furosemida a dosis de 10 mg/Kg. ⁽¹⁷⁾

Sánchez (1999); en la experiencia clínica evidenció una disminución del colesterol-LDL en sangre, para ser transformado en ácidos biliares. Es un depurativo hepático por excelencia, su acción colagoga se debe a la gran cantidad de sustancias amargas que contiene. Además, es un regulador del metabolismo de las grasas, por lo que se utiliza para reducir la obesidad de tipo exógeno. ⁽¹⁸⁾

1.1.1.3 Estudios toxicológicos:

Rojas (1999); determinó que la dosis letal media DL50, fue mayor a 3000 g/Kg., debido a que ésta fue la máxima concentración que se pudo lograr y no se observó ninguna alteración en el comportamiento de los animales ni en su apariencia. ⁽¹⁹⁾

Ríos (2008); determinó la toxicidad aguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Gentianella alborosea* a dosis de 2000 mg/Kg., mediante los métodos de Dosis Límite y Clases Tóxicas Agudas (CTA) en ratones y ratas albinas de ambos sexos, respectivamente. Según sus resultados, el extracto acuoso liofilizado de *Gentianella alborosea* a dosis de 2000 mg/Kg., no presentó toxicidad aguda por los métodos ensayados. ⁽²⁰⁾

Herrera & Huarsaya (2008); realizaron un estudio a dosis repetida durante 90 días del extracto acuoso liofilizado de *Gentianella alborosea* a dosis de 0.5 y 1.0 mg/Kg., en ratas albinas cepa Holtzman. Encontraron ligeras variaciones en la bioquímica sanguínea, como disminución de los niveles del colesterol y aumento de la creatinina. En el análisis macroscópico no encontraron alteraciones visibles de toxicidad. Concluyeron que el extracto no tuvo ningún efecto tóxico. ⁽²¹⁾

Almeida & Rodríguez (2008); determinaron el efecto genotóxico del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Gentianella alborosea*, a dosis de 1600 mg/Kg., en células germinales mediante el ensayo *in vivo* de anomalías en la cabeza de espermatozoides de ratón. Encontraron que *Gentianella alborosea* no presentó espermatozoides anormales en comparación al control positivo de Ciclofosfamida 40 mg/Kg. ⁽²²⁾

1.1.2 *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. “Uña de gato o gavián”



1.1.2.1 Estudios fitoquímicos:

Hemingway & Phillipson (1974); encontraron por cromatografía de capa fina la presencia de alcaloides en las hojas y raíces de *Uncaria guianensis*; siendo estos la pteropodina, isoteropodina y especiofilina. ⁽²³⁾

Yépez et al. (1991); aislaron dos nuevos ácidos glucosídicos quinóvicos de *Uncaria guianensis*, denominándolos como ácido quinóvico 3 beta-O-beta-D-quinovopiranosida y ácido quinóvico 3 beta-O-beta-D-fucopiranosilo-(27-1)-beta-D-glucopiranosilester; la estructura química de ambos fue elucidada por estudios espectrales y químicos. ⁽²⁴⁾

1.1.2.2 Estudios farmacológicos:

Carvalho et al. (2006); investigaron las propiedades antiinflamatoria y antialérgica de un extracto etanólico de las hojas de *Uncaria guianensis*. El tratamiento con *Uncaria guianensis* a dosis de 200 mg/Kg., inhibió el edema plantar y exudado pleural en ratones albinos. En la propiedad antialérgica, los datos *in vitro* revelaron que *U. guianensis* redujo la producción de óxido nítrico y macrófagos, así como la síntesis de interleucina-5. Sus resultados demostraron que las hojas *U. guianensis* tienen efectos antiinflamatorio y antialérgico. ⁽²⁵⁾

Correia et al. (2008); realizaron una evaluación de la actividad antimicrobiana de 10 extractos crudos de plantas medicinales contra 7 especies de bacterias resistentes a tratamiento antibacteriano por el

método de Kirby-Bauer. Dentro de ellos el extracto de *Uncaria guianensis* mostró actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.⁽²⁶⁾

Encinas & Vásquez (2008); Estudiaron el efecto antiulceroso de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis* a dosis de 100 y 200 mg/Kg., sobre lesiones gástricas inducidas por Indometacina U.S.P. (20 mg/Kg.) y Etanol a 96° en ratas albinas cepa Holtzmann. Utilizaron Ranitidina U.S.P (50 mg/Kg.) como control positivo y NaCl 0.9 % como control negativo. Sus resultados indicaron que los extractos acuosos liofilizados de *Uncaria tomentosa* a dosis de 200 mg/Kg. y *Uncaria guianensis* a dosis de 100 y 200 mg/Kg., son capaces de inhibir lesiones gástricas inducidas por Indometacina y etanol a 96°. Además, observaron que *Uncaria guianensis* presentó mayor capacidad de protección de la mucosa gástrica que *Uncaria tomentosa*.⁽²⁷⁾

1.1.2.3 Estudios toxicológicos:

Ríos et al. (2006); realizaron un estudio de toxicidad aguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Uncaria guianensis* mediante el método de Clases Tóxicas Agudas (CTA), emplearon dosis prefijadas de 2000, 200 y 25 mg/Kg., utilizaron ratas albinas cepa Holtzmann de ambos sexos. Según sus resultados a dosis de 2000mg/Kg., no se observaron signos clínicos que evidencien toxicidad ni alteraciones macroscópicas a nivel de órganos diana. Por tanto, se clasificó al extracto acuoso liofilizado de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. como ATC0 NO TOXICA al no ocurrir mortalidad a las dosis ensayadas.⁽²⁸⁾

Ríos et al. (2006); evaluaron la toxicidad aguda oral del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Uncaria guianensis* a dosis de 2000 mg/Kg., en ratones albinos cepa Balb/C-53. Concluyeron que el extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Uncaria guianensis*, resultó no tóxico a dosis de 2000 mg/Kg., por vía oral, mediante el método de Dosis límite.⁽²⁹⁾

Tenazoa (2006); evaluó el potencial toxicológico a dosis repetida durante 90 días del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Uncaria guianensis* a dosis de 100 y 300 mg/Kg., por vía oral en ratas albinas cepa Holtzmann de ambos sexos. No observó signos clínicos tóxicos en los grupos experimentales. Los resultados hematológicos y bioquímicos sanguíneos reflejaron ligeras variaciones entre grupos sin significancia biológica, ya que todos los parámetros se encontraron dentro del rango fisiológico normal. El análisis macroscópico no evidenció alteración de los órganos diana. Concluyó que el extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Uncaria guianensis* no presenta toxicidad tras una exposición prolongada de 90 días. ⁽³⁰⁾

Gonzales & Pinedo (2008); evaluaron el potencial genotóxico de los extractos acuosos liofilizados del látex de *Croton lechleri*, y las hojas de *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* en espermatozoides de ratón, a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg. Concluyeron que los extractos acuosos liofilizados no presentaron potencial genotóxico en ninguna de las dosis evaluadas ya que no hubo mayor presencia de espermatozoides con cabezas anormales. ⁽³¹⁾

1.1.3 *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. “Uña de gato”

1.1.3.1 Estudios fitoquímicos:

Senatore et al. (1989); identificaron en la corteza esteroides tipo campesterol, β -sitosterol y estigmasterol. ⁽³²⁾

Aquino et al. (1990); aislaron 3 nuevos triterpenos polihidroxilados a partir del extracto CHCl_3 de la corteza de *Uncaria tomentosa* asignados como: 1, 2 y 3. ⁽³³⁾

Laus et al. (1997); identificaron alcaloides oxindólicos de la corteza, liana y raíz de *Uncaria tomentosa* como: Mitrafilina, isomitrafilina, pteropodina, isopteropodina, especiolina, uncarina F, rincofilina e isorincofilina. ⁽³⁴⁾

Gonçalves et al. (2005); determinaron la propiedad antioxidante de la decocción de *Uncaria tomentosa*. Concluyeron que *Uncaria tomentosa* posee una elevada capacidad antioxidante, por la buena captación de los radicales libres en los métodos de: DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo), anión superóxido, anión peroxilo y radicales hidroxilo. Así también, en las especies oxidantes, Peróxido de Hidrógeno y ácido hipocloroso. ⁽³⁵⁾

1.1.3.2 Estudios farmacológicos:

Ccahuana et al. (2007); evaluaron la actividad antimicrobiana de *Uncaria tomentosa* contra patógenos orales humanos, tales como *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus spp.*, *Candida albicans*, *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Concluyeron que *Uncaria tomentosa* presenta una actividad antimicrobiana en *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus spp.* ⁽³⁶⁾

Consentino & Torres (2008); describieron una reversibilidad de los signos motores en pacientes con la enfermedad de Parkinson al ser tratados con *Uncaria tomentosa* por vía oral. ⁽³⁷⁾

1.1.3.3 Estudios toxicológicos:

Rizzi et al. (1993); evaluaron el extracto liofilizado de la corteza de *Uncaria tomentosa* a dosis de 2000 mg/Kg., mediante el ensayo de anomalías en la cabeza de espermatozoides del ratón. Según sus resultados *U. tomentosa* no mostró efecto genotóxico, ya que el porcentaje de anomalías en la cabeza de los espermatozoides no fue estadísticamente significativa. ⁽³⁸⁾

Silva et al. (1997); calcularon la dosis letal media (DL50) del extracto liofilizado de la corteza de *Uncaria tomentosa*, inoculada vía intraperitoneal a ratones albinos cepa Balb/C. La DL50 calculada fue de 0.431801 g/Kg., de p.c., a las 72 horas de administrada el extracto. ⁽³⁹⁾

Ríos (1998); determinó el grado de toxicidad o DL50 de la corteza seca de *Uncaria tomentosa* administrada por vía oral a ratones albinos cepa Balb/C. La DL50 calculada fue mayor que 17.86 g/Kg., de peso corporal a las 72 horas de administrada el extracto, y fue clasificada según el criterio de Williams como “Relativamente inocua”.⁽⁴⁰⁾

Mestanza et al. (2000); determinaron el posible efecto genotóxico de la corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. a dosis de 2000, 1000 y 500 mg/Kg/día por vía oral, mediante el ensayo *in vivo* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón. En la prueba realizada no se detectaron daño citotóxico ni la ocurrencia de efectos genotóxicos.⁽⁴¹⁾

Paniagua et al. (2000); evaluaron *in vivo* el potencial genotóxico del Oxindol y β -sitosterol en médula ósea de ratón; ambos compuestos presentes en *Uncaria tomentosa*, mediante las técnicas de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), Cinética de Proliferación Celular, Índice Mitótico y Frecuencia de Micronúcleos. Los resultados muestran que tanto el Oxindol como β -sitosterol no son inductores de ICH. En la cinética de proliferación no se observó modificación del ciclo celular con las dosis probadas y el índice mitótico presentó datos citotóxicos únicamente con las dosis más altas de Oxindol pero sin significancia estadística. Estos resultados sugieren que estos compuestos no son genotóxicos con las dosis probadas, sin embargo se sugiere evaluar el efecto antimutagénico que se le atribuye en un sistema de prueba *in vivo*.⁽⁴²⁾

Romero et al. (2005); analizaron la actividad genotóxica y antigenotóxica de infusiones de algunas plantas medicinales, una de ellas fue *Uncaria tomentosa*. La actividad antigenotóxica fue analizada usando el Test de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en *Drosophila melanogaster*. El Peróxido de Hidrógeno fue utilizado como agente genotóxico. De acuerdo a sus resultados obtenidos, ninguna de las infusiones mostró una genotoxicidad significativa, por el contrario todas las plantas fueron desintoxicantes del Peróxido de Hidrógeno; dicha

capacidad es conferida a los compuestos fenólicos presentes en las plantas. ⁽⁴³⁾

Delgado & Riquelme (2007); realizaron un estudio de toxicidad a dosis repetida durante 90 días del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Uncaria tomentosa* a dosis de 100 y 300 mg/Kg., en ratas albinas cepa Holtzmann. No observaron signos clínicos de toxicidad. Hubo variación de los valores de bioquímica sanguínea con significancia estadística, en la histopatología se observó daño de moderado a severo en los hígados de las ratas albinas tratados con la dosis de 300 mg/Kg. Concluyeron que el extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Uncaria tomentosa* a dosis de 300 mg/Kg., administrado durante 90 días; posee efecto tóxico en el hígado de *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann. ⁽⁴⁴⁾

Cruz (2007); realizó una evaluación del potencial toxicológico a dosis repetida durante 90 días del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Uncaria tomentosa* a dosis de 100 y 300 mg/kg por vía oral, en ratas albinas cepa Holtzmann de ambos sexos. Según sus resultados, los valores hematológicos y bioquímicos sanguíneos reflejaron ligeras variaciones entre grupos, sin significancia biológica. En el análisis macroscópico no evidenció alteración en los órganos de las ratas albinas de ambos sexos. En el análisis histopatológico de hígados y riñones observó lesiones degenerativas reversibles. Concluyó que el extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Uncaria tomentosa* a dosis de 100 y 300 mg/Kg., presenta efecto hepatotóxico y nefrotóxico. ⁽⁴⁵⁾

Chin et al. (2008); verificaron las propiedades antimutagénica de *Uncaria tomentosa* en un modelo de la Prueba de Ames modificada, donde se empleó *Salmonella typhimurium* TA-102 his(-) en 2 grupos, 1 control y 1 experimental; este último se dividió en 4 subgrupos tratados con dosis crecientes de *U. tomentosa*. El resultado observado fue una reversión de colonias, inversamente proporcional a la dosis del liofilizado de *U. tomentosa*. Concluyeron que *U. tomentosa* posee propiedades antimutagénicas en este modelo experimental. ⁽⁴⁶⁾

Paniagua et al. (2009); estudiaron los efectos antígenotóxico y antioxidante producidos por la pteropodina; un alcaloide oxindólico extraído de “Uña de gato”. La actividad antioxidante fue evaluada por el método DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo), la cual exhibió una fuerte capacidad para captar los radicales libres (98.26% con 250 µ/ml). El efecto antígenotóxico fue evaluado por los ensayos de Micronúcleos e Intercambio de Cromátidas Hermanas, de la cual pteropodina (100 – 600 mg/Kg.) corrigió los efectos genotóxicos inducidos por Doxorubicina. Según sus resultados, pteropodina es un antimutágeno efectivo en los modelos usados. ⁽⁴⁷⁾

1.2 Plantas estudiadas utilizando el ensayo cometa

Pereira et al. (2006), investigaron el potencial mutagénico del extracto de *Tamarindus indica*, a dosis de 1000, 1500 y 2000 mg/Kg., utilizaron Ciclofosfamida como control positivo. La investigación se llevó a cabo en ratas Wistar de ambos sexos, 3 machos y 3 hembras por cada grupo experimental. Sus resultados revelaron que *T. indica* no presentó efectos genotóxicos sobre las células hepáticas y células periféricas de ratas wistar a las dosis ensayadas. ⁽⁴⁸⁾

Brugés & Reguero (2007), evaluaron los extractos etanólicos de *Sida rhombifolia L.* sobre los linfocitos en el Ensayo Cometa, siendo el extracto etanólico de raíces el que presentó mayor genotoxicidad (CL50 35 ppm); y el extracto acuoso de hojas presentó una baja genotoxicidad (CL50 900 ppm). ⁽⁴⁹⁾

Alvis et al. (2008), evaluaron el efecto protector al ADN del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* 2% en ratones albinos por un periodo de 35 días. Evaluaron 3 tipos de células: del hígado, riñón y linfocitos. Según sus resultados, el extracto acuoso del fruto del “Camu camu”, tiene la propiedad de proteger al DNA contra el daño oxidativo producido por el KBrO₃ en los tres tipos celulares evaluados. ⁽⁵⁰⁾

1.3 Bases teóricas

1.3.1 Aspectos generales de *Gentianella alborosea* (Gilg) Fabris

La familia Gentianaceae consiste de unos 75 géneros y aproximadamente 1000 especies de distribución cosmopolita, pero más común en regiones templadas y subtropicales y en pequeñas montañas tropicales. El género más grande es *Gentianella*, con 400 especies. ⁽⁵¹⁾

La palabra “Hjircan purek” es de origen quechua y significa “el que camina de pueblo en pueblo”, haciendo alusión a los médicos del Imperio de los Incas que recorrían los pueblos llevando en sus alforjas diversas plantas de uso medicinal. ⁽⁵²⁾

El “Hercampuri” es conocido y recomendado por sus propiedades como hepatoprotector y reductor de colesterol, debido a que actúa como desintoxicante y diurético, regula el metabolismo de las grasas corporales sin riesgo de causar anorexia y reduce los riesgos de problemas cardiovasculares. ⁽⁵³⁾

1.3.1.1 Clasificación taxonómica

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Gentianales

Familia: Gentianaceae

Género: *Gentianella*

Especie: *Gentianella alborosea* (Gilg) Fabris ⁽⁵⁴⁾

1.3.1.2 Nombres vulgares

En Perú, *Gentianella alborosea* es conocida con los siguientes nombres vulgares o vernaculares: “hercampure”, “hercampuri”, “hilcampure”, “té amargo”, “té de Chavín”, “harcapura”, “hir-campurek”, “hjircan purek”, “té indio”. ⁽⁵⁵⁾

1.3.1.3 Descripción botánica

Es una planta anual o perenne, 5 cm. de altura como máximo, de raíz retorcida, agrietada y rugosa, que llega a medir el doble del tamaño de la planta; tallo herbáceo, corto, de color marrón oscuro; hojas pequeñas de 0.5 a 1 cm., simples, opuestas, lanceoladas, sésiles de color verde oscuro, sus flores solitarias o dispuestas en inflorescencia cimosa, son hermafroditas de 0.5 a 1 cm., de color lila o violeta, fruto en capsula deciente, que contiene gran cantidad de semillas color marrón oscuro o negro. ^{(18), (56), (57)}

1.3.1.4 Distribución geográfica

Planta oriunda de los andes sudamericanos. Se encuentra a la orilla de los lagos y en suelo húmedo. Crece en la región alto andina entre los 2800 a 4300 m.s.n.m. en la puna de Huánuco, Junín, Ayacucho, Ancash, Amazonas, Cuzco, Cerro de Pasco, Cajamarca, Puno. ^{(16), (18), (56) (57)}

1.3.1.5 Composición química

Contiene eritaurina, xantonas (formadas por ciclización de bezofenonas), alcaloides heterósidos, cumarinas, sustancias amargas de tipo glucosídico, sustancias antracénicas. Azúcares (gencianosa, gecibiosa y sacarosa), taninos, triterpenoides, leucoantocianidinas, catequinas, saponinas, resinas, ceras, hemicelulosa, posible presencia de ácidos fenólicos, fitosterol; contiene además: aluminio, calcio, magnesio, potasio, sodio, cloro y también se reporta un sesquiterpeno denominado alborosin. ^{(16), (18), (56), (58)}

1.3.1.6 Usos medicinales

Las hojas y tallos se usan por su propiedad colagoga, colerética, reguladora del metabolismo de las grasas, hipocolesterolémica, diurética, microbicida, fungicida, hipoglicemiante, várices; antiguamente también se utilizaba para combatir la fiebre posiblemente producida por el paludismo. ^{(16), (18), (59)}

1.3.2 Aspectos generales de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.

La Familia Rubiaceae es grande, pantropical y subtropical encontrándose en forma abundante en el norte de Sudamérica. Cuenta con aproximadamente 500 géneros y 7000 especies. En el Perú se conocen 89 géneros. Del género *Uncaria* se conocen hasta 50 especies en todo el mundo, pero en el Perú se hallan únicamente 2.

Uncaria viene de "uncus", palabra latina que significa gancho; todas las especies de este género tienen grandes espinas ganchudas. Tomentosa significa "cubierta de vellos finos".⁽⁶⁰⁾

1.3.2.1 Clasificación taxonómica

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Género: *Uncaria*

Especie: *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.⁽⁵⁴⁾

1.3.2.2 Nombres vulgares

En Perú, *Uncaria guianensis* es conocida con los siguientes nombres vulgares o vernaculares:

Región Loreto: "garabato blanco".

Región Ucayali: "uña de gato del bajo", "bejuco de agua".

Región San Martín: "garabato".

Departamento del Cuzco: "garabato amarillo".

Departamento de Madre de Dios: "uña de gato", "garra gavilán" y "deixa paraguayo".⁽⁶¹⁾

1.3.2.3 Descripción botánica

Es una liana que puede llegar a 30 m. de longitud, 10 a 30 cm. de diámetro; presenta espinas fuertemente retorcidas o recurvadas desde su inicio en forma de “cuernos de carnero”; sus hojas son coriáceas elipticobovadas, abruptamente corto acuminadas, truncada en la base, hasta 18 por 12 cm., glabras excepto por algunos tricomas a lo largo de las venas en el envés, poseen un corto pecíolo con 8 a 9 nervaduras; inflorescencia en cabezuelas terminales de 2.5 a 3 cm. de diámetro; las flores son pediceladas de color rojo anaranjado de 10 mm. de largo y piloso; los frutos son cápsulas dehiscentes de 3.5 a 4 mm. de largo. Semillas fusiformes, longitudinales, imbricadas, de 11 mm. de largo. ⁽⁶²⁾, ⁽⁶³⁾, ⁽⁶⁴⁾, ⁽⁶⁵⁾

1.3.2.4 Distribución geográfica

Se encuentra distribuida en Perú, Bolivia, Brasil, Guyanas, Colombia, Venezuela. En nuestro país se ubica en la vertiente amazónica de los Andes, entre los 0 a 800 m.s.n.m., se describió en los departamentos de Loreto (desembocadura del río Santiago, en las localidades de Yurimaguas, Puerto Arturo, Río Itaya y la Campuya), Ucayali, San Martín, Amazonas, Ayacucho, Cuzco, Huánuco y Madre de Dios. ⁽⁶²⁾, ⁽⁶⁶⁾, ⁽⁶⁷⁾

1.3.2.5 Composición química

En la corteza se describen taninos, como las proantocianidinas, presencia de rincofilina, isorincofilina, pteropodina, especiofilina y mitrafilina en las hojas y raíces. En nuestro país describen mitrafilina en las hojas y en la corteza, la presencia de flavonoides como el kaempferol, dihidrokaempferol y el 5-7 dihidroxi dihidroflavonol; además de glicósidos del ácido quinóico. ⁽⁶⁵⁾, ⁽⁶⁸⁾, ⁽⁶⁹⁾, ⁽⁷⁰⁾

1.3.2.6 Usos medicinales

Se utiliza en las inflamaciones dérmicas y en vías genitourinarias, asma, úlcera gástrica, diabetes, diversas tumoraciones, enfermedades

degenerativas, cáncer (tracto genital femenino, broncopulmonar, gástrico, etc.), procesos virales, irregularidades del ciclo menstrual, convalecencia y “debilidad general”, gonorrea, inmunoestimulante, etc. ⁽⁶⁾

1.3.3 Aspectos generales de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.

La “Uña de gato” *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. es una liana que crece en las selvas de América del Sur, donde durante casi 2.000 años se ha utilizado con fines medicinales.

Se trata de una gran liana trepadora o a veces rastrera de más de 40 m. de longitud y que puede llegar a los 20 m. de altura.

En la zona del envés se observa la presencia de pequeñísimos y finos vellos, llamados tomentos, que se disponen densamente en toda su extensión, característica de la que proviene el nombre de tomentosa. ⁽⁷¹⁾

1.3.3.1 Clasificación taxonómica

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Género: *Uncaria*

Especie: *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. ⁽⁵⁴⁾

1.3.3.2 Nombres vulgares

En Perú, *Uncaria tomentosa* es conocida con los siguientes nombres vulgares o vernaculares:

Región Loreto: “uña de gato”, “deixa paraguayoy”, “garabato colorado”.

Región Ucayali: “uña de gato de altura”, “bejuco de agua”.

Región San Martín: “garabato”.

Departamento del Cuzco: “garabato amarillo”.

Departamento de Madre de Dios: “uña de gato”, “garra gavián” y “deixa Paraguayo”.⁽⁶¹⁾

1.3.3.3 Descripción botánica

Es una liana, cuyo tallo principal puede alcanzar un grosor de 25 cm. y una longitud total de hasta 40 m. Las ramas jóvenes tienen forma cuadrangular. Presencia de espinas ganchudas, macizas y leñosas que llegan a tener 2 cm. de largo por 0.4 a 0.6 cm. de ancho, dirigidas hacia abajo, no retorcidas. Hojas pecioladas, limbo de consistencia membranosa, de forma oblonga u oblongo-aovado de aproximadamente 9 a 17 cm. de longitud; por 4 a 9 cm. de ancho agudo o redondeado en ápice, haz de color verde amarillo y el envés de color verde pálido presenta finos vellos largos y cortos, que es lo que da a esta especie el nombre de tomentosa. Inflorescencias de 9 cm. de largo con racimos pequeños de 5 cabezuelas de 1 a 3.5 cm. de largo y 0.8 a 3 mm. de ancho cuyo diámetro varía entre 1.5 a 2 cm.; las flores son amarillentas con 5 estambres sésiles, corola infundiliforme, glabra en cara adaxial; el fruto es bivalvo y alargado, mide hasta 6 mm. de longitud. Las semillas son fusiformes, muy pequeñas, longitudinales y aladas.⁽⁶³⁾

1.3.3.4 Distribución geográfica

Se distribuye en la parte septentrional de América Latina, diseminada en Perú, Brasil, Bolivia, Colombia, Nicaragua, Venezuela, Panamá (Bocas del Toro, Valles del Río Gatún), Guyanas, Trinidad y Tobago, Ecuador. En Perú se encuentra en la zona central y ceja de la selva, específicamente en las regiones de Loreto, Ucayali (Yarinacocha), San Martín (Inca, Mariscal Cáceres, Wari y Tarapoto), Junín, Chanchamayo, La Merced, Oxapampa, Pozuzo, Amazonas, Ayacucho y Cuzco.^{(62), (66), (67)}

1.3.3.5 Composición química

Se han aislado unos 50 componentes de esta planta incluyendo alcaloides, glicósidos del ácido quinóico, otros triterpenos, proantocianidinas y esteroides; 35 de estos compuestos se han aislado únicamente en un par de especies más y de estos 35 compuestos, 15 han sido identificados como nuevos compuestos.

Las hojas y el tallo de *Uncaria tomentosa* contienen alcaloides oxindólicos pentacíclicos (isopteropodina isomitrafalina dihidrocorinanteína, pteropodina, rincofilina, uncarina, especiofilina, mitrafalina, isorincofilina, hirsutina), compuestos polihidroxiados, epicatequina, procianidinas, estigmasterol y campesterol.⁽⁷⁰⁾

1.3.3.6 Usos medicinales

Se utiliza para la amigdalitis, como anticonceptivo, artritis, artrosis, asma, diversos tipos de cáncer, diabetes, disentería, estomatitis, gonorrea, inflamaciones en general, tumoraciones, úlceras gástricas, procesos vírales, prostatitis.⁽⁶⁾

1.4 Toxicología genética

La toxicología genética es, por definición, el estudio de la forma en que agentes químicos o físicos afectan al complejo proceso de la herencia. Las sustancias químicas genotóxicas son compuestos capaces de modificar el material hereditario de las células vivas.

La probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño genético depende inevitablemente de diversas variables, como el nivel de exposición del organismo a la sustancia, la distribución y retención de ésta una vez que ha penetrado en el cuerpo, la eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o detoxificación en los tejidos diana y la reactividad de la sustancia o de sus metabolitos con macromoléculas críticas de las células.

La probabilidad de que el daño genético produzca una enfermedad depende en última instancia de la naturaleza del daño, la capacidad que posee la célula de reparar o amplificar el daño genético, la oportunidad de expresar cualquier

alteración que se haya inducido y la capacidad del cuerpo de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes.

Debido a su relativa abundancia en las células, las proteínas son la diana más frecuente de la interacción tóxica. No obstante, preocupa más la modificación del ADN por la importante misión de éste como regulador del crecimiento y la diferenciación a lo largo de múltiples generaciones de células.

Al nivel molecular, los compuestos electrófilos tienden a atacar al oxígeno y el nitrógeno del ADN.

Aunque también son dianas de la modificación química los oxígenos de los grupos fosfato del esqueleto del ADN, se estima que tiene más importancia biológica el daño a las bases, ya que estos grupos están considerados como los elementos primarios de información de la molécula de ADN.

Es característico que los compuestos que contienen una sola unidad electrófila causen la genotoxicidad produciendo monoadductos en el ADN. Análogamente, los compuestos que contienen dos o más unidades reactivas pueden reaccionar con dos centros nucleófilos distintos y de esa manera producir entrecruzamientos (crosslinks) intra o intermoleculares en el material genético.

Los entrecruzamientos ADN-ADN y ADN-proteína pueden ser especialmente citotóxicos, pues pueden formar bloques completos para la replicación del ADN. Por razones obvias, la muerte de la célula elimina la posibilidad de que sufra una mutación o una transformación neoplásica.

Los agentes genotóxicos pueden actuar también induciendo roturas en el esqueleto fosfodiéster, o entre bases y azúcares del ADN (produciendo lugares abásicos). Esas roturas pueden deberse directamente a reactividad química en el lugar del daño, o pueden producirse durante la reparación de uno de los tipos de lesión del ADN antes mencionados. ⁽⁷²⁾

1.4.1 Sustancias genotóxicas

Las sustancias genotóxicas pueden unirse directamente al ADN o actuar indirectamente afectando enzimas involucradas en la replicación del ADN y causar mutaciones. ⁽⁷³⁾

1.4.2 Las pruebas de genotoxicidad

Las pruebas para detectar agentes que dañan al ADN son de gran importancia, pues los compuestos genotóxicos tienen la capacidad de alterar el material genético en los organismos, incluido el hombre, y además pueden tener efectos teratogénicos, causar mutaciones en las células germinales, inducir enfermedades cardíacas, influir en los procesos de envejecimiento y generar mutaciones en las células somáticas que pueden contribuir al desarrollo del cáncer. Algunas de las pruebas utilizadas para detectar el daño genético son el cariotipo, el estudio del índice mitótico, el intercambio de cromátides hermanas, el ensayo cometa, el estudio de la inducción de apoptosis, la prueba de Ames y la prueba de micronúcleos. ⁽⁷⁴⁾

1.5 Electroforesis

Se define como electroforesis, a aquel proceso en el cual, las especies cargadas - iones o partículas coloidales - se separan, en función de su distinta velocidad de migración, cuando se encuentran sometidas a la acción de un campo eléctrico.

La velocidad con que las diferentes sustancias se desplazan durante el transcurso de la electroforesis, se denomina *velocidad de migración*.

Dicha magnitud, depende básicamente de la densidad de la carga y ésta a su vez está condicionada por una serie de parámetros (pH, fuerza iónica, diferencia de potencial del campo eléctrico aplicado, naturaleza de la muestra, interacciones de la misma con el soporte elegido, etc.) que van a condicionar el desarrollo experimental de la técnica electroforética.

La electroforesis es una herramienta práctica para el análisis de mezclas de compuestos biológicos, ya que permite separar macromoléculas en una mezcla, sirviendo tanto de método *analítico*, como *preparativo* para la posterior realización de otras técnicas analíticas.

Para que esta separación tenga lugar, es necesario que la sustancia se encuentre cargada, de manera que al colocarla en el seno de un campo eléctrico se desplace hacia un polo u otro en función de su carga.

De forma general, las sustancias cargadas positivamente se dirigirán hacia el polo negativo -cátodo- y las cargadas negativamente hacia el polo positivo -ánodo-.⁽⁷⁵⁾

1.5.1 Electroforesis en gel de células aisladas

El ensayo cometa es una técnica sencilla, rápida y sensible para analizar el daño en el ADN en células individuales. Su nombre deriva de la apariencia que cobran las células tras la realización del ensayo: una cabeza intensamente brillante, y una cola cuya longitud e intensidad están relacionadas con la cantidad de roturas de cadena del ADN que contiene. En contraste, las células no dañadas presentan aspecto de núcleos intactos, sin cola. Esto es debido a la migración de los fragmentos de ADN dañado hacia el ánodo, al ser sometida la célula a una diferencia de potencial durante una electroforesis.⁽⁷⁶⁾

1.5.2 Fundamento del ensayo cometa

El fundamento de la técnica consiste en lisar las células de interés, embebidas en un gel de agarosa sobre un portaobjetos, por medio de detergentes y altas concentraciones de sal. Posteriormente, el ADN liberado es sometido a la acción de un campo eléctrico a pH neutro. En las células que existan incremento del daño al ADN se formarán pequeños fragmentos. Estos, al ser sometidos a una corriente eléctrica, tendrán la propiedad de penetrar en la malla de agarosa migrando, de esta manera, hacia el ánodo. La capacidad del ADN de migrar hacia el ánodo dependerá del tamaño de los fragmentos generados por la lesión. Por medio de la coloración con bromuro de etidio (colorante con afinidad por el ADN) ó nitrato de plata, darán la imagen de pequeños cometas. El largo del cometa se incrementa con el daño inducido a la doble hélice del ADN.⁽⁷⁷⁾

1.5.3 Ventajas del ensayo cometa

Las ventajas de esta técnica incluyen:

- ✓ Los datos son colectados al nivel de células individuales, brindando información de la distribución intercelular del daño y de la reparación;
- ✓ Se requieren pequeños números de células (unos pocos miles).
- ✓ Virtualmente cualquier población de células eucariotas puede ser utilizada. ⁽⁷⁸⁾

1.5.4 Aplicaciones del ensayo cometa

1. Estudios de genotoxicidad (*in vivo* e *in vitro*).
2. Reparación del ADN.
3. Apoptosis.

Aplicaciones clínicas:

1. El diagnóstico prenatal.
2. La susceptibilidad de cáncer.
3. La terapia de cáncer.
4. La diabetes mellitus.
5. La artritis reumatoide.
6. Lupus eritematoso sistémico.

Biomonitoreo:

1. Envejecimiento.
2. El ejercicio.
3. Mala nutrición.
4. El ozono.
5. El biomonitoreo ambiental, acuático/terrestre. ⁽⁷⁹⁾

II. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., no son genotóxicos en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann.

III. DEFINICIONES OPERACIONALES

3.1. Variables:

3.1.1 Variable independiente

Extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa*.

3.1.2 Variables dependientes

Efecto genotóxico de los extractos evaluados según:

- ✓ Método visual: Unidades Arbitrarias.
- ✓ Momento de la Cola Olive.
- ✓ Porcentaje de ADN en la cabeza.

3.1.3 Variable interviniente

Sexo de los animales de experimentación.

3.2 Indicadores

3.2.1 Indicador de la variable independiente

Dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., de peso corporal.

3.2.2 Indicadores de las variables dependientes

- ✓ **Método visual: Unidades Arbitrarias (UA)**

Clasificación visual de los cometas según el daño ocasionado al ADN, en relación al largo de la cola.

Grado 0: Células no dañadas, sin cola.

Grado 1: Células ligeramente dañadas, con cola menor al tamaño de la cabeza.

Grado 2: Células dañadas, con cola igual al tamaño de la cabeza.

Grado 3: Células fuertemente dañadas, con cola mayor al tamaño de la cabeza.

Grado 4: Células en apoptosis.

- ✓ **Momento de la Cola Olive:** Es el producto de la distancia entre el centro de gravedad de la cabeza y el centro de gravedad de la cola dividido por el porcentaje de ADN en la cola.

$$\text{MCO} = \frac{(\text{CG Cabx} - \text{CG Colx})}{\% \text{ ADN Col}} \times 100$$

Donde:

CG Cabx = Centro de gravedad de la cabeza.

CG Colx = Centro de gravedad de la cola.

% ADN Col = Porcentaje de ADN en la cola.

- ✓ **Porcentaje de ADN en la cabeza:** Es el producto de la sumatoria de intensidades entre la cabeza dividido por las sumatoria de las intensidades en la cola por 100.

$$\% \text{ ADN Cabeza} = \frac{\sum \text{ Intensidades en la cabeza}}{\sum \text{ Intensidades en la cola}} \times 100$$

Donde:

\sum **Intensidades en la cabeza** = Sumatoria de intensidades en la cabeza.

\sum **Intensidades en la cola** = Sumatoria de intensidades en la cola.

3.2.3 Indicador de la variable interviniente

- ✓ Sexo de los animales de experimentación: Macho o hembra.

3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

Variable independiente	Definición conceptual	Indicador	Definición operacional	Escala y tipo de variable	Índice
Extracto acuoso liofilizado de <i>Gentianella alborosea</i> , <i>Uncaria guianensis</i> y <i>Uncaria tomentosa</i> .	Producto de la extracción acuosa por cocción, congelado y liofilizado sin sufrir variaciones en su composición química.	Efecto potencialmente genotóxico de los extractos acuosos liofilizados de <i>Gentianella alborosea</i> , <i>Uncaria guianensis</i> y <i>Uncaria tomentosa</i> a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg. de peso corporal.	Determinación de la genotoxicidad, según el método visual (unidades arbitrarias), momento de la cola olive y porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas; en ambas dosis de las sustancias en ensayo.	Escala: Nominal. Tipo de Variable: Cualitativa y cuantitativa.	Genotóxico No genotóxico

Operacionalización de variables (Continuación)

VARIABLES DEPENDIENTES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	INDICADOR	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA Y TIPO DE VARIABLE	ÍNDICE
Método visual: Unidades Arbitrarias.	Hallazgo objetivo de un observador, tras la administración de la sustancia de origen natural o sintético.	Grado 0, 1, 2, 3 y 4; dependiendo del largo de la cola del cometa en relación al tamaño de la cabeza.	Identificación del daño inducido en el ADN de los linfocitos, siendo las colas de los cometas fragmentos del ADN; en los animales que reciben los extractos acuosos liofilizados.	Escala: Ordinal. Tipo de variable: Cualitativa y cuantitativa.	0 UA: No genotóxico. 400 UA: Genotóxico
Momento de la cola olive. Porcentaje de ADN en la cabeza.	Mediciones de la cantidad de ADN presente en el linfocito mediante un software informático.	Centro de gravedad de la cabeza, centro de gravedad de la cola y porcentaje de ADN en la cola del cometa. Sumatoria de intensidades en la cabeza e intensidades en la cola.	Determinación de parámetros microscópicos, para medir alteraciones o daños causados al ADN de los linfocitos en los grupos experimentales.	Escala: Nominal. Tipo de variable: Cuantitativa.	Genotóxico. No genotóxico.

Operacionalización de variables (Continuación)

Variable interviniente	Definición conceptual	Indicador	Definición operacional	Escala y tipo de variable.
Sexo	Clasificación en macho o hembra basada en numerosos criterios, entre ellos las características anatómicas externas y cromosómicas.	Sexo macho. Sexo hembra.	Determinación según el sexo del animal, para evaluar el daño inducido en el ADN de los linfocitos.	Escala: Nominal. Tipo de variable: Cualitativa

CAPÍTULO III

I. METODOLOGÍA

1.1 Tipo de investigación

1.1.1 Tipo de estudio

La evaluación fue del tipo experimental y prospectivo.

Experimental analítico: se realizó comparaciones de las variables dependientes entre los grupos experimentales y de controles positivos; y negativo.

Prospectivo: en el registro de los datos se tomaron en cuenta todos los hechos a partir del inicio del estudio.

1.2 Diseño de investigación

Ensayo experimental preclínico con grupos aleatorios bajo condiciones de laboratorio controladas. El estudio fue realizado con ratas albinas *Rattus norvegicus*, cepa Holtzmann, con peso corporal de 150 a 200 g., de ambos sexos y edad promedio de 6 a 8 semanas; los cuales fueron administrados según grupo experimental los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg. de p.c., durante 5 días por vía oral. Los animales fueron evaluados dos veces al día hasta el término del ensayo (7 a.m. y 7 p.m.).

1.3. Población y muestra

1.3.1 Población vegetal

La población vegetal estuvo constituida por las plantas de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa*. Procedentes de la ciudad de Lima (Chosica) y del jardín botánico del Instituto de Medicina Tradicional – IMET – EsSalud. Distrito de San Juan, respectivamente.

1.3.2 Muestra vegetal

La muestra vegetal estuvo constituida por los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, obtenidos a partir de 300 g., de la planta entera. Y los extractos acuosos liofilizados de *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa*, obtenidos a partir de 500 g., de hojas para cada uno. Los cuales fueron sometidos a un proceso de liofilización, con el propósito de deshidratar las muestras vegetales.

1.3.3 Criterios de inclusión de la muestra vegetal

- ✓ Planta entera en buen estado.
- ✓ Hojas frescas, enteras y en buen estado.

1.3.4 Criterios de exclusión de la muestra vegetal

- ✓ Planta entera, con hongos y hojas deterioradas.
- ✓ Hojas parasitadas, con hongos, en mal estado.

1.3.5 Población animal

La población animal estuvo constituida por ratas albinas *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann de ambos sexos, procedentes del Centro Nacional de Producción de biológicos del Instituto Nacional de Salud del MINSA, con sede en la ciudad de Lima.

1.3.6 Muestra animal

La muestra animal estuvo conformada por 72 ratas albinas *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann de ambos sexos, 8 animales por grupo experimental (4 machos y 4 hembras). Con edad promedio de 6 a 8 semanas, con peso corporal entre 150 a 200 g.

Distribuidos de la siguiente manera:

Grupo	Dosis o concentración	Número de animales
Control negativo	NaCl 0.9 %	8 (4 ♂ y 4 ♀)
Controles positivos	H ₂ O ₂ 1%	8 (4 ♂ y 4 ♀)
	Ciclofosfamida 50 mg/Kg.	8 (4 ♂ y 4 ♀)
<i>G. alborosea</i>	1000 mg/Kg.	8 (4 ♂ y 4 ♀)
	2000 mg/Kg.	8 (4 ♂ y 4 ♀)
<i>U. guianensis</i>	1000 mg/Kg.	8 (4 ♂ y 4 ♀)
	2000 mg/Kg.	8 (4 ♂ y 4 ♀)
<i>U. tomentosa</i>	1000 mg/Kg.	8 (4 ♂ y 4 ♀)
	2000 mg/Kg.	8 (4 ♂ y 4 ♀)

Donde:

♂= Machos

♀= Hembras

1.3.7 Criterios de inclusión de la muestra animal

- ✓ Animales con certificado de salud emitido por el Instituto Nacional de salud, con sede en la ciudad de Lima (**Anexo N° 01**).
- ✓ Animales que pasaron el periodo de cuarentena (7 días).
- ✓ Animales que presentaron un peso entre 150 a 200 g.
- ✓ Animales hembras no grávidas y nulíparas.

1.3.8 Criterios de exclusión de la muestra animal

- ✓ Animales que no presentaron el peso promedio establecido.
- ✓ Animales que no cumplieron la edad promedio establecida.
- ✓ Animales que fueron utilizados en ensayos anteriores.

1.4. Procedimiento experimental

1.4.1 Selección y recolección de las muestras vegetales:

La planta entera de *Gentianella alborosea* fue proveniente de la ciudad de Lima y las hojas de *Uncaria guianensis* y *U. tomentosa* fueron recolectadas del Jardín Botánico del IMET – EsSalud. Para la selección de las muestras vegetales se tuvo en consideración los siguientes factores:

- ✓ Edad de la planta.
- ✓ Cumplir con los criterios de inclusión.

➤ **Identificación taxonómica de las muestras vegetales**

Las identificaciones taxonómicas se realizaron en el *Herbarium Amazonense* (AMAZ) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) con sede en el distrito de Iquitos, Provincia de Maynas de la Región Loreto. (Anexo N° 02)

1.4.2 Obtención de los extractos acuosos liofilizados:

✓ **Selección de materia prima**

Fueron seleccionadas las partes vegetales (planta entera y hojas) en buen estado de conservación.

✓ **Lavado de materia prima**

Las partes vegetales fueron sometidas a la acción de un chorro continuo de agua para despojarlos de contaminantes (tierra, insectos, etc.).

✓ **Obtención de los extractos acuosos**

De la planta entera de “Hercampuri” se realizó una infusión durante 10 minutos en proporción 1:10 (P/V).

Con las hojas de “Uña de gato” se realizó una cocción durante 2 horas en proporción 1:10 (P/V), a temperatura entre 60° a 70 °C; luego se dejó enfriar al medio ambiente, posteriormente se filtró con algodón, se dejó 72 horas en reposo bajo refrigeración, con la finalidad de que las partículas insolubles

sedimenten. Transcurrido ese tiempo, se procedió a filtrar con papel de filtro, para luego concentrar por cocción a 60-70 °C, hasta obtener un volumen aproximado a 1 litro y finalmente congelarlos.

✓ **Congelación de los extractos acuosos**

Se congelaron los extractos a -20 °C, por más de 48 horas.

✓ **Liofilización de los extractos acuosos**

Este proceso consistió en deshidratar los extractos acuosos congelados a una temperatura y presión de vapor (-40 °C y 1.33×10^{-3} Mbar) mediante sublimación durante 72 horas, aproximadamente.

✓ **Pesado, envasado y rotulado de los extractos liofilizados**

Se pesaron los extractos liofilizados en una balanza analítica y rotularon la fecha de envasado y almacenamiento.

✓ **Almacenado**

Se almacenaron en un ambiente seco a temperatura menor de 25 °C, en frasco con cierre hermético y protegido de la luz.

1.4.3 Etapa de acondicionamiento, aclimatación y sistema de identificación de los animales:

✓ **Etapa de acondicionamiento y aclimatación**

Los animales fueron sometidos a condiciones de aclimatación y acondicionamiento por 7 días, con la finalidad de que se adapten a su nuevo entorno ambiental; además estuvieron en observación permanente. Aquellos que presentaron alguna alteración funcional o enfermedad fueron excluidos del ensayo. Las condiciones de luz y oscuridad (12 horas luz/12 horas oscuridad); y temperatura (25 ± 2 °C) fueron controladas. Además de haber tenido agua y alimento *ad libitum*.

✓ **Sistema de identificación (Marcado y pesado de los animales)**

Todos los animales fueron marcados con solución de Picrato de sodio, sobre determinadas áreas del cuerpo (Frente, lomo, cola, pata delantera derecha, blanco), para luego ser asignados de forma aleatoria para cada grupo experimental.

1.4.4 Evaluación genotóxica

✓ **Prueba de genotoxicidad - Electroforesis de células individuales o Ensayo Cometa (Anexo N° 03)**

Para determinar el efecto genotóxico en el ADN de los linfocitos, se utilizó la técnica SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis) o Ensayo Cometa, según el protocolo descrito por Singh N. *et al.* ⁽⁸⁰⁾

* **Soluciones de trabajo**

Las soluciones de trabajo fueron preparadas en el momento de realizar la evaluación; con la finalidad de obtener resultados óptimos, y fueron los siguientes:

- Solución Salina de Kenny pH 7.62
- Solución de Lisis pH 10
- Solución alcalina pH 13.7
- Buffer de neutralización pH 7.53
- Solución de fijación
- Soluciones de tinción: A y B
- Solución de detención de tinción
- Buffer PBS 10 X
- Agarosa de bajo punto de fusión 1%
- Agarosa de punto de fusión normal 3%

* **Preparación de las láminas portaobjetos.**

Las láminas portaobjetos fueron desinfectadas con alcohol de 70°, posteriormente se colocaron en un extremo de la lámina 350 µL de agarosa de punto de fusión normal y se realizó un extendido de la agarosa

con la ayuda de otra lámina portaobjeto. Se dejó secar durante 20 min. a 4°C.

*** Grupos de ensayo experimental**

Para la evaluación genotóxica, cada grupo de ensayo fue sometido a un control basal; es decir que los linfocitos de todos los animales fueron evaluados mediante el ensayo cometa antes de cada tratamiento por cada grupo experimental. Las tomas de muestra sanguínea fueron realizadas en las primeras horas de la mañana (7 a.m.).

✓ **Grupo control negativo – NaCl 0.9%**

Se realizó el control basal de los animales con previo ayuno de 12 horas, 24 horas después se administró la solución salina durante 5 días por vía oral con cánula intragástrica curva metálica; 24 horas después de la última administración se realizó la toma de muestra sanguínea y posterior evaluación mediante el Ensayo Cometa.

✓ **Grupo controles positivo**

*** Peróxido de Hidrógeno – H₂O₂ 1%**

Previo ayuno de 12 horas, se realizó la toma de muestra sanguínea, para después exponer los linfocitos embebidos en el gel de agarosa de bajo punto de fusión en solución de H₂O₂ 1%, durante 30 minutos a 4 °C y protegidos de la luz; para evitar la reparación del ADN. Posteriormente se realizó la evaluación mediante el Ensayo Cometa.

*** Ciclofosfamida 50 mg/Kg.**

Se realizó el control basal de los animales con previo ayuno de 12 horas, 24 horas después se administró la Ciclofosfamida a dosis de 50 mg/Kg. de p.c., durante 5 días por vía intraperitoneal con jeringa de 1 ml. y aguja N° 25 x 5/8"; 24 horas después de la última administración se realizó la toma de muestra y posterior evaluación mediante el Ensayo Cometa.

✓ **Administración de los extractos acuosos liofilizados**

Para la dilución de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *U. tomentosa*, se empleó como solvente NaCl 0.9%, se determinó el factor de volumen y la concentración según las dosis a ensayar, haciendo uso de una tabla de dosificación (**Anexo N° 04**). Luego se determinó el peso corporal promedio de los animales según los grupos experimentales y realizó el cálculo para cada dosis (**Anexo N° 05**).

La administración de los extractos acuosos liofilizados se realizó en las primeras horas de la mañana, con un previo ayuno de 12 horas. Dicha administración fue durante 5 días por vía oral empleando una cánula intragástrica curva metálica (**Foto N° 01**). Luego se procedió a dar alimento y agua a los animales ya administrados. 24 horas después de la última administración se realizó la toma de muestra para la posterior evaluación mediante el Ensayo Cometa.

* **Toma de muestra sanguínea – Punción cardíaca**

Se realizó la toma de muestra sanguínea por punción cardíaca con una jeringa de 1 ml y aguja N° 23x1"; se procedió de la siguiente manera:

- Se sujetó al animal sobre una base firme, quedando en posición de cúbito dorsal en la palma de la mano del manipulador.
- Luego se desinfectó con alcohol de 70° la zona del tórax, se determinó el punto máximo de latido del corazón; y realizó la punción cardíaca.

Se obtuvo 600 µL. de sangre, aproximadamente (**Foto N° 02**).

- La muestra de sangre obtenida fue vertida en un microtubo conteniendo anticoagulante (proporción 1:10 (v/v) (**Foto N° 03**).

* **Procesamiento de la muestra**

Separación de los linfocitos

Se procedió a separar los linfocitos por el método de centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll.

- Se colocó 500 μ L. de sangre en un microtubo con 500 μ L. de Ficoll (**Foto N° 04**) y centrifugó en la microcentrifuga a 2000 r.p.m. por 10 minutos.
- Se observó un halo en la capa media del microtubo (**Foto N° 05**), se obtuvo el halo con la micropipeta y se colocó en otro microtubo, luego de separar todo el halo, se procedió a enrasar con solución PBS 1X hasta 2 ml., luego se llevó a la microcentrifuga a 4000 r.p.m. por 5 minutos.
- Se descartó el sobrenadante y realizó el procedimiento una vez más con la finalidad de realizar el lavado de los linfocitos, posteriormente se enrasó hasta 500 μ L con solución PBS 1X.
- Finalmente se realizó la observación de los linfocitos en la cámara de Neu Bauer, para verificar la viabilidad de los mismos.

*** Mezclado de los linfocitos con el gel de agarosa**

- Se mezcló 42 μ L. de los linfocitos aislados con 378 μ L de agarosa de bajo punto de fusión, dicha mezcla fue al 10 %.
- Se colocó 70 μ L. de la mezcla en una lámina portaobjetos previamente recubierta con una capa de agarosa de punto de fusión normal. Se cubrió la suspensión celular con una lámina cubreobjetos y mantuvo a 4 °C durante 20 minutos, para la solidificación de los geles.
- Luego se retiró el cubreobjetos y las láminas fueron sumergidas en la solución de PBS 1X durante 30 minutos, transcurrido ese tiempo se lavaron con agua desionizada fría.

*** Lisis**

Posteriormente se sumergieron las láminas en la solución de lisis a 4 °C durante 12 horas (**Foto N° 06**); al término de la lisis, se lavó las láminas con abundante agua desionizada fría para luego dejarlas secar por 30 minutos.

* **Electroforesis**

Se sumergieron las láminas en solución alcalina a 4 °C durante 10 minutos. Luego, se realizó la electroforesis en solución alcalina durante 20 minutos a 30 Voltios y 240 miliAmperes (mA) (**Foto N° 07**). Al término de la electroforesis, se lavaron las láminas con abundante agua desionizada fría.

* **Neutralización**

Las láminas fueron sumergidas en la solución de neutralización durante 10 minutos, dicho procedimiento fue realizado en un agitador horizontal a 60 r.p.m. (**Foto N° 08**), con la finalidad de homogenizar la neutralización en todo el campo de los geles de agarosa. Transcurrido el tiempo, las láminas fueron lavadas con agua desionizada fría en las mismas condiciones que fueron neutralizadas.

* **Fijación**

Luego se sumergieron las láminas en la solución de fijación en las mismas condiciones que la solución de neutralización. Posteriormente se lavaron con abundante agua desionizada fría.

* **Tinción.**

Se realizó la tinción con Nitrato de plata (10 minutos aproximadamente); la cual estuvo constituida por las soluciones de tinción A y B (**Foto N° 09**). Transcurrido ese tiempo, se observaron al microscopio para evaluar la correcta tinción de las células; la cual se observó células de color negro.

* **Solución de detención de la tinción.**

Finalmente se agregaron sobre los geles la solución de detención de tinción (1 ml. aproximadamente) (**Foto N° 10**), durante 10 minutos; con la finalidad de detener la tinción. Luego se lavaron los geles con abundante agua desionizada fría y dejaron secar por 24 horas (**Foto N°**

11); posteriormente se realizó el conteo de los cometas o células (100 por cada animal) y clasificaron según el grado de daño inducido en el ADN.

*** Sacrificio de los animales de experimentación.**

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, teniendo en cuenta los principios éticos en la experimentación animal. ⁽⁸¹⁾

1.5 Materiales, equipos y reactivos

1.5.1 Materiales

1.5.1.1 Material vegetal

Extractos acuosos liofilizados, de la planta entera de *Gentianella alborosea*, fueron recolectados en la ciudad de Lima (Chosica); y de las hojas de *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa*, recolectadas del jardín botánico del Instituto de Medicina Tradicional – EsSalud, ubicado en el distrito de San Juan en la ciudad de Iquitos, capital del Departamento de Loreto, a orillas del río Amazonas en la Selva Baja, a una altura de 116 m.s.n.m., latitud sur de 03° 45' 18'' y longitud oeste de 73° 14' 00'' aproximadamente, en una zona de vida considerada bosque húmedo tropical, con terreno de tipo franco arenoso, ligeramente ácido y buen contenido de materia orgánica. Presenta una temperatura media anual de 26° C y una precipitación pluvial de 2,727 mm. al año.

1.5.1.2 Material animal

72 ratas albinas *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann con edad aproximada de 6 a 8 semanas, procedentes del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Salud – MINSA, con sede en la ciudad de Lima.

1.5.1.3 Materiales de laboratorio

- ✓ Micropipetas de 1 – 10, 10 – 100 y 100 – 1000 μ L.
- ✓ Tips o puntas para micropipetas de 1 – 10, 10 – 100 y 100 – 1000 μ L.
- ✓ Vasos de precipitado de 25ml, 50 ml, 100 ml.
- ✓ Matraz de Erlen Meyer de 25ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml y 1000 ml.
- ✓ Probetas de 25 ml, 50 ml, 100 ml y 500 ml.
- ✓ Microtubos de 1.5 ml.
- ✓ Gradilla para microtubos.
- ✓ Cámara de Neu Bauer.
- ✓ Placas petri.
- ✓ Láminas porta objetos.
- ✓ Láminas cubre objetos.
- ✓ Espátula mediana.
- ✓ Picetas.
- ✓ Algodón hidrófilo.
- ✓ Jeringas descartables de 1y5ml.
- ✓ Aguja N° 23 x 1”.
- ✓ Guantes quirúrgicos descartables.
- ✓ Mascarillas descartables.
- ✓ Cánula intragástrica.
- ✓ Marcador de vidrio.
- ✓ Papel filtro.
- ✓ Papel toalla.
- ✓ 8 Bandejas plásticas con tapa de malla metálica y viruta.

1.5.2 Equipos

- ✓ Microscopio con cámara incorporada - Nikon Eclipse E 200.
- ✓ Cámara de electroforesis + Fuente de poder - Consort E143
- ✓ Microcentrífuga - Jovan A 14.
- ✓ Liofilizador - Freezer Dry system/ Freezone 4,5 L Labconco.
- ✓ Balanza analítica - Mettler Toledo AG 204.
- ✓ Balanza digital - Ohaus® Compact Portable Balance.
- ✓ Agitador horizontal - Heidolph Unimax 1010.

- ✓ Desionizador de agua - Barnstead, Easy Pure® II.
- ✓ Destilador de agua - H.W. Kessel.
- ✓ Agitador magnético - Thermolyne, Nouva II, Stir Plate.
- ✓ Estufa - Memmert UE 400.
- ✓ Autoclave – Linux Intermedical Trade.
- ✓ Potenciómetro o pH-metro - Orion 250 A+.
- ✓ Congeladora - Friolux.
- ✓ Refrigeradora - Friolux.
- ✓ Cocina eléctrica - Teba Toes.
- ✓ Cámara fotográfica digital - Canon de 7 Megapíxeles.

1.5.3 Reactivos

- ✓ Cloruro de Sodio 0.9 % - Merck p.a.
- ✓ Cloruro de sodio 0.4 y 2.5 M. - Merck p.a.
- ✓ Cloruro de potasio 9 mM. - Merck p.a.
- ✓ Fosfato de potasio 0.7 mM. - Fisher Scientific. p.a.
- ✓ Fosfato de sodio - Merck p.a.
- ✓ Bicarbonato de sodio 2 mM. - Merck p.a.
- ✓ TRIS 10 y 0.4 mM. - Applichem p.a.
- ✓ EDTA 1 y 100 mM. - Merck p.a.
- ✓ Tritón X-100 1% – Aldrich p.a.
- ✓ Dimetil sulfóxido 10% – Sigma p.a.
- ✓ Hidróxido de sodio 300 mM. - Merck p.a.
- ✓ Ácido tricloroacético 15 % – Riedel-De Haën, USP XXI
- ✓ Sulfato de zinc 5% - Fisher Scientific. p.a.
- ✓ Glicerol 5% - Merck p.a.
- ✓ Carbonato de sodio 5% - Aldrich p.a.
- ✓ Nitrato de amonio 0.2% - Aldrich p.a.
- ✓ Nitrato de plata 0.2% - Aldrich p.a.
- ✓ Ácido tungstosilícico 0.5% - Aldrich p.a.
- ✓ Formaldehído 0.15% - Fisher Scientific. p.a.
- ✓ Ácido acético 1% - Panreac.
- ✓ Agarosa de bajo punto de fusión 1% - Applichem p.a.

- ✓ Agarosa de punto de fusión normal 3% - Applichem p.a.
- ✓ Ficoll Histopaque – Plus.
- ✓ Anticoagulante Wintrobe – Lab. Farma.
- ✓ Alcohol medicinal 90°.
- ✓ Azul de Tripan. – Sigma.
- ✓ Peróxido de Hidrógeno 1% - Erza®
- ✓ Ciclofosfamida Q.P.

1.6. Técnicas usadas en la recolección de datos

Se utilizó las técnicas de observación y registro.

1.6.1. Peso corporal

Se registraron los pesos corporales en la tarjeta diseñada para el control de marca y peso, para cada animal según grupo experimental. (**Anexo N° 06**)

1.6.2. Conteo, clasificación y análisis de los cometas

✓ Método visual: Unidades Arbitrarias (UA)

La técnica utilizada fue observacional (conteo de los cometas o células) y de registro de los cometas en grados del daño al ADN, según el largo de las colas en relación al tamaño de la cabeza (**Anexo N° 07**). Las unidades arbitrarias fueron registradas en la ficha de evaluación genotóxica (**Anexo N° 08**).

✓ Software Informático: Comet Score v. 1.5

Se registró y analizaron los cometas con el software Comet score v. 1.5, para obtener las siguientes mediciones:

- Momento de la Cola Olive (MCO).
- Porcentaje de ADN en la cabeza (% ADN cabeza).

1.7. Procedimientos de recolección de datos

1.7.1 Control del peso corporal

El peso de los animales marcados y pesados fue anotado en la ficha marca y peso de los animales, para la identificación de cada uno de ellos por cada grupo experimental. El peso corporal fue registrado al inicio y al final del ensayo.

1.7.2 Conteo, clasificación y análisis de los cometas

El análisis de los cometas se realizó por dos métodos, un método visual, del cual se obtuvieron las Unidades Arbitrarias; y por un software informático el Comet Score v. 1.5, del cual se obtuvieron las siguientes mediciones: El Momento de la Cola Olive y el Porcentaje de ADN en la cabeza.

✓ **Método visual: Unidades Arbitrarias.**

El análisis visual clasificó los cometas de la siguiente manera ⁽⁸²⁾:

Grado 0: Células no dañadas, sin cola.

Grado 1: Células ligeramente dañadas, con cola menor al tamaño de la cabeza.

Grado 2: Células dañadas, con cola igual al tamaño de la cabeza.

Grado 3: Células fuertemente dañadas, con cola mayor al tamaño de la cabeza.

Grado 4: Células en apoptosis.

*** Obtención de las Unidades Arbitrarias (UA)**

Al terminar el conteo de las 100 células por muestra, se sumó del total de células en cada nivel de daño y se multiplicó por su mismo nivel de daño, para finalmente obtener la sumatoria de estas multiplicaciones.

Por ejemplo, si se obtuvo en el conteo de una muestra: Total = 100 células:

30 células x grado 0 = 0

23 células x grado 1 = 23

20 células x grado 2 = 40

17 células x grado 3 = 51

10 células x grado 4 = 4

$$\Sigma = 154 \text{ UA}$$

La clasificación de daño por medio de unidades arbitrarias se encuentra en un intervalo de 0 a 400, siendo 0 el menor daño y 400 el mayor daño. Si se obtuvieron 100 células en el nivel 0, la multiplicación consiste en 100 células x 0, dando un total de 0 UA, lo cual corresponde a células intactas, sin daño. Mientras que un valor de 400 UA, corresponde a células completamente dañadas, proviniendo de la multiplicación de 100 células x nivel 4. ⁽⁸³⁾

✓ **Software Informático - Comet Score v. 1.5**

Se tomaron fotografías con la cámara digital incorporada al microscopio y fueron analizadas con el software Comet Score v. 1.5, proporcionado por la empresa TriTek-Corp. ⁽⁸⁴⁾

Las variables evaluadas para determinar el efecto en el ADN fueron:

➤ **El Momento de la Cola Olive (MCO):**

Es el producto de la distancia entre el centro de gravedad de la cabeza y el centro de gravedad de la cola dividido por el porcentaje de ADN en la cola.

$$\text{MCO} = \frac{(\text{CG Cabx} - \text{CG C Colx})}{\% \text{ ADN Col}} \times 100$$

➤ **El porcentaje de ADN en la cabeza (% ADN cabeza):**

Es el producto de la sumatoria de intensidades entre la cabeza dividido por las sumatoria de las intensidades en la cola por 100.

$$\% \text{ ADN cabeza} = \frac{\Sigma \text{ Intensidades en la cabeza}}{\Sigma \text{ Intensidades en la cola}} \times 100$$

1.8. Análisis e interpretación de datos

- ✓ El análisis estadístico de los datos (Media aritmética y Desviación estándar) se realizó con el programa estadístico Microstat.
- ✓ Se realizó el análisis de varianza de una vía (One Way) – ANOVA, utilizando el programa estadístico Microstat con significancia de $p < 0.05$ y nivel de confianza del 95%.
- ✓ Las fichas de registros de datos sirvieron para recolectar la información necesaria para el procesamiento estadístico, con la finalidad de elaborar tablas y gráficos correspondientes a cada variable.
- ✓ Tablas para representar las variables dependientes.
- ✓ Los gráficos de barras fueron utilizados para representar las variaciones de peso corporal.
- ✓ Mediante gráficos de barras se representaron los valores de las Unidades Arbitrarias (UA), Momento de la cola olive (MCO) y Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas (% ADN cabeza); según sexo de los animales y por cada grupo experimental.

Resumen de las variables y técnicas empleadas para el análisis e interpretación de los datos

Variable	Técnicas	Representación
Unidades Arbitrarias. (Cualitativa y Cuantitativa)	Media aritmética. Desviación estándar.	Tablas Gráfico de barras.
Momento de la cola olive. (Cuantitativa)	Media aritmética. Desviación estándar.	Tablas Gráfico de barras.
Porcentaje de ADN en la cabeza del cometa. (Cuantitativa)	Media aritmética. Desviación estándar.	Tablas Gráfico de barras.

1.9. Protección de los derechos de los animales

La experimentación con animales ha permitido un desarrollo cada vez más acelerado de los conocimientos biológicos y del bienestar del hombre y de los propios animales. Por ello el destino de estas especies ha comenzado a despertar un gran interés, y evitar o disminuir su sufrimiento ha sido objeto de numerosos estudios en las últimas décadas.

Esto ha llevado al establecimiento de múltiples reglamentaciones y, por otro lado, ha hecho pensar en las relaciones con el medio ambiente, el cual se ve afectado. ⁽⁸⁵⁾

Las ciencias biomédicas y otras afines avanzan rápidamente con la utilización de modelos animales adecuados, que posibilitan la evaluación de nuevos medicamentos para el tratamiento y prevención de diferentes enfermedades. También, es éticamente reconocido que no se deben emplear nuevos medicamentos, sustancias, ni dispositivos en seres humanos a menos que las pruebas previamente efectuadas en animales permitan hacer una suposición razonable de su inocuidad.

En efecto, los editores de las principales revistas biomédicas exigen que los investigadores declaren haber seguido las normas de la propia institución y las leyes nacionales sobre el cuidado y uso de animales.

Por tanto, el empleo de animales de experimentación para predecir los probables efectos de ciertos procedimientos que se aplicarían en el ser humano implica responsabilidad por el bienestar animal. ⁽⁸⁶⁾

En ocasiones es incluso más ético y razonable el uso de métodos alternativos. ⁽⁸⁷⁾

Principios éticos que aseguran el bienestar del animal de experimentación

1. Posibilitar el mínimo de manipulaciones al animal y las intervenciones en su entorno, evitando perturbarlo o provocarle reacciones de alerta o refugio.
2. Ofrecerle un entorno confortable y protegido en cuanto a agentes físicos, químicos y biológicos.
3. Lograr la seguridad del confinamiento, evitando su escape o fuga, la penetración de otros animales, la exposición a daños y la ausencia de peligros.
4. Las áreas de alojamiento de los animales deben responder a los requerimientos establecidos, para la actividad de que se trate.

5. Lograr los objetivos del experimento, ensayo o validación con el mínimo de variables de tiempo y de animales. ⁽⁸⁸⁾

La regla de las 3R

La experimentación con animales debe ser afrontada intentando minimizar los daños y sufrimientos que se infligen a los animales, y producir estos daños sólo cuando hay una causa proporcionada. En concreto, siempre es posible realizar dicha investigación si el objetivo final que se persigue es el bien humano.

Como es obvio, aunque esté justificado producir algún daño a los animales, siempre será preferible que este daño no exista o sea el menor posible, pues, a fin de cuentas, se produce voluntariamente (aunque no sea la intención que se pretenda).

De aquí se deriva la regla de las tres erres, que es un tema obligado en la ética de la experimentación animal, que pretende reducir esos daños colaterales a los animales. Afortunadamente, esas tres erres, que son iniciales de palabras inglesas, se traducen al castellano sin forzar demasiado el significado de los términos: reemplazar, reducir y refinar.

Reemplazar

La primera R se refiere a reemplazar, es decir, sustituir los animales de laboratorio por equivalentes que no empleen animales de ningún tipo: cambiar los animales por otras cosas.

Este campo es probablemente el más activo en los últimos tiempos. Por una parte, la presión de los grupos contrarios al empleo de animales en experimentación ha forzado a la búsqueda de dichos procedimientos. Por otra parte, también ha influido la negativa científica a aceptar la fiabilidad para el hombre de los resultados obtenidos en animales. Por último, el crecimiento del alumnado en las Facultades de Ciencias y Medicina ha hecho necesario buscar métodos de prácticas que familiaricen a los alumnos con los animales, su anatomía, fisiología, etc., sin verse obligados a emplear gran número de ellos.

Reducir

En segundo lugar, se trataría de reducir el número de animales empleados en la investigación. Para este objetivo, conviene que colabore con el investigador un experto

en estadística, pues muchas veces se escoge el número de animales para cada grupo de experimentación de modo más o menos arbitrario (6, 10) sin que se sepa justificar el porqué de esa cifra.

Es necesario hacer un cálculo inverso: partir del número de resultados que precisamos, lo cual depende del tipo de cálculo estadístico que queremos realizar; podremos averiguar el número de animales de los que hemos de partir.

Existen paquetes de software especializados en este tipo de cálculo inverso, que permiten averiguar de antemano el número de animales que debe tener cada muestra o grupo.

Refinar

Por último, la tercera R se refiere a refinar. Con este término, se engloban los procedimientos que pretenden minimizar el sufrimiento o la ansiedad de los animales empleados en la experimentación, o los que cambian una especie por otra con menor capacidad sensitiva.

Por tanto, aunque esté justificado infligir un daño a algún animal por el bien del hombre, este daño es algo completamente contra natura para el animal, y, por tanto, debería ser minimizado. Esa labor de minimizar el sufrimiento o la angustia animal es la tarea de refinar la experimentación. ⁽⁸⁹⁾

CAPÍTULO IV

I. RESULTADOS

1.1 Peso corporal

Si bien el control del peso corporal de los animales no fue objetivo de la evaluación genotóxica, pero es un indicador importante en los estudios de toxicidad.

Puesto que no existen registros del peso corporal de ratas albinas administradas durante 5 días con los extractos de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis*, *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg.

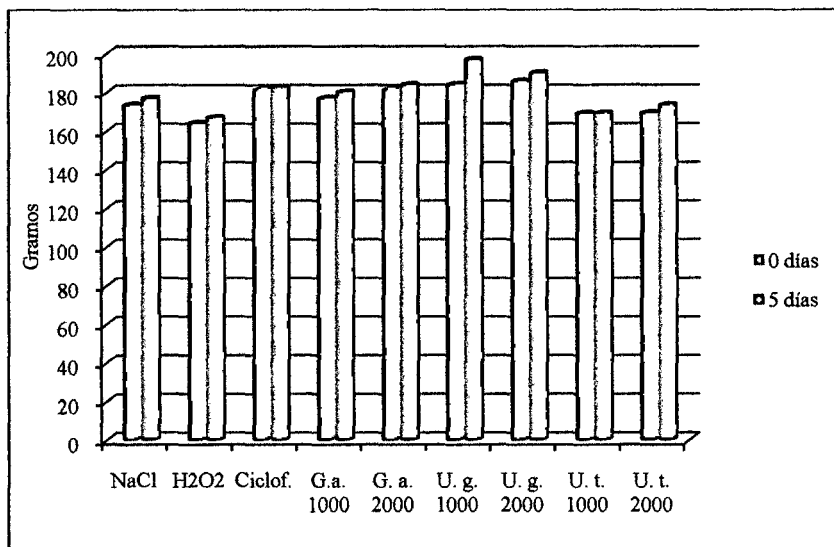
Los resultados de la media aritmética y desviación estándar del peso corporal en ratas albinas machos y hembras se presentan en los **Anexos N° 09 y 10**, respectivamente.

Al realizar el análisis estadístico de las medias no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p>0.05$) al ser comparados con los controles basales.

Los **Gráficos N° 01 y 02** representan las variaciones del peso corporal en ratas albinas machos y hembras respectivamente; se observa que en ningún caso hubo pérdida de peso y la tendencia al aumento fue una constante durante el estudio en todos los grupos de tratamiento, y en ambos sexos.

Gráfico N° 01

Variaciones del peso corporal en ratas albinas machos. (g)



NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

G.a.: *Gentiana alborosea*

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno 1%.

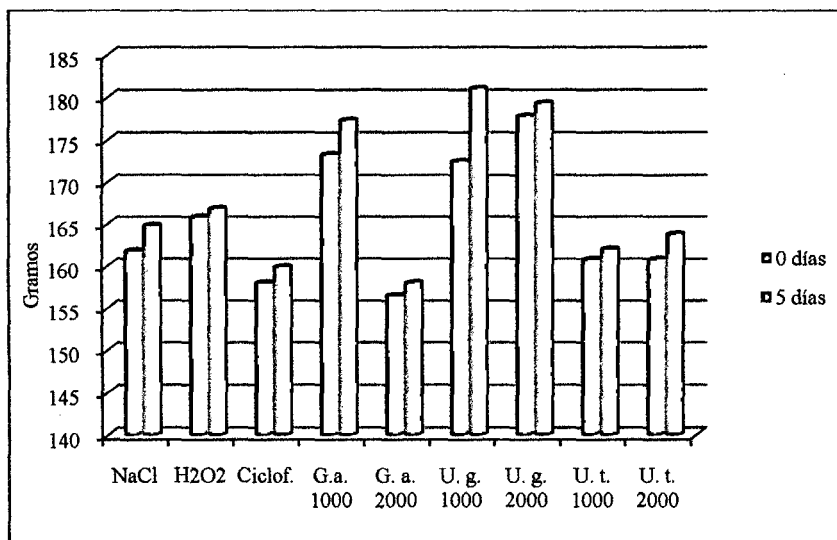
U.g.: *Uncaria guianensis*

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

U.t.: *Uncaria tomentosa*

Gráfico N° 02

Variaciones del peso corporal en ratas albinas hembras. (g)



NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

G.a.: *Gentiana alborosea*

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno 1%.

U.g.: *Uncaria guianensis*

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

U.t.: *Uncaria tomentosa*

1.2 Unidades Arbitrarias (UA)

a) El análisis estadístico de las Unidades Arbitrarias en ratas albinas machos tratados con los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., se presenta en la **Tabla N° 01. (Anexo N° 11)**

- * El mayor valor de Unidades Arbitrarias lo presentaron las células expuestas con Peróxido de Hidrógeno 1% con valores de $307 \pm 7,23$, mientras que los valores de Unidades Arbitrarias con Ciclofosfamida 50 mg/Kg., fue de $247 \pm 26,72$.
- * Los promedios de Unidades Arbitrarias obtenidos a dosis de 1000 mg/Kg., con los extractos de *Gentianella alborosea* fue de $51 \pm 26,89$, *Uncaria guianensis* con $51 \pm 12,40$ y *Uncaria tomentosa* de $40 \pm 10,05$.
- * El mayor promedio de Unidades Arbitrarias a dosis de 2000 mg/Kg., se obtuvo con el extracto de *Uncaria guianensis* con $91 \pm 11,35$; *Uncaria tomentosa* con $82 \pm 6,90$ y *Gentianella alborosea* fue de $58 \pm 7,23$.

Tabla N° 01

Valores de Unidades Arbitrarias en ratas albinas machos. (UA)

Grupo Experimental	Basal X±D	Tratados X±D
NaCl 0,9%	4±2.36	5±2.45
H₂O₂ 1%	3±0.82	307±7.23 *
Ciclofosfamida 50 mg/Kg	5±3.46	247±26.72 *
<i>Gentianella alborosea</i> 1000 mg/Kg	8±7.63	51±26.89 *
<i>Gentianella alborosea</i> 2000 mg/Kg	4±2.75	58±7.23 *
<i>Uncaria guianensis</i> 1000 mg/Kg	8±2.22	51±12.40 *
<i>Uncaria guianensis</i> 2000 mg/Kg	9±1.91	91±11.35 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 1000 mg/Kg	13±1.83	40±10.05 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 2000 mg/Kg	5±4.11	82±6.90 *

X±SD: Promedio ± Desviación estándar

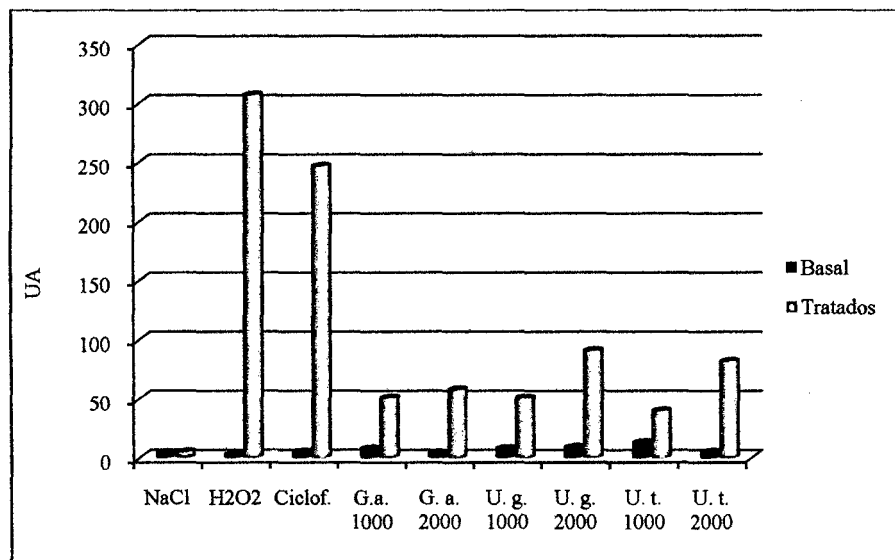
* = $p < 0.05$

En el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los grupos tratados con los extractos, al ser comparados con los controles basales.

Las variaciones de las Unidades Arbitrarias se representan en el **Gráfico N° 03**.

Gráfico N° 03

Variaciones de las Unidades Arbitrarias en ratas albinas machos. (UA)



NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentiana alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

b) El análisis estadístico de las Unidades Arbitrarias en ratas albinas hembras tratadas con los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., se presentan en la **Tabla N° 02. (Anexo N° 12)**

- * El mayor valor de Unidades Arbitrarias lo presentaron las células expuestas con Peróxido de Hidrógeno 1% con valores de 319±9,47; mientras que los valores de Unidades Arbitrarias con Ciclofosfamida 50 mg/Kg., fue de 289±18,22.
- * El mayor promedio de Unidades Arbitrarias obtenidos a dosis de 1000 mg/Kg., fue con el extracto de *Uncaria guianensis* con 72±13,33, seguido de *Gentianella alborosea* con 60±15,73 y *Uncaria tomentosa* de 47±7,68.
- * El mayor promedio de Unidades Arbitrarias obtenidos a dosis de 2000 mg/Kg., fue con el extracto de *Uncaria guianensis* con 87±20,28, seguido de *Gentianella alborosea* con 82±16,68 y *Uncaria tomentosa* de 52±15,26.

Tabla N° 02

Valores de unidades arbitrarias en ratas albinas hembras. (UA)

Grupo Experimental	Basal X±D	Tratados X±D
NaCl 0,9%	5±4.03	7±2.50
H₂O₂ 1%	6±3.10	319±9.47 *
Ciclofosfamida 50 mg/Kg	6±2.99	289±18.22 *
<i>Gentianella alborosea</i> 1000 mg/Kg	6±3.86	60±15.73 *
<i>Gentianella alborosea</i> 2000 mg/Kg	10±4.08	82±16.68 *
<i>Uncaria guianensis</i> 1000 mg/Kg	4±2.06	72±13.33 *
<i>Uncaria guianensis</i> 2000 mg/Kg	8±6.58	87±20.28 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 1000 mg/Kg	12±1.91	47±7.68 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 2000 mg/Kg	7±5.69	52±15.26 *

X±SD: Promedio ± Desviación estándar

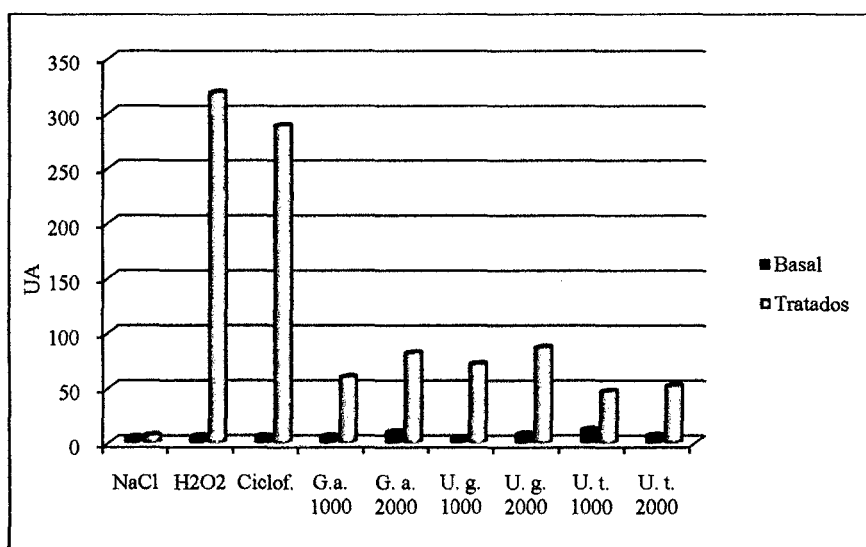
* = $p < 0.05$

En el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los grupos tratados con los extractos, al ser comparados con los controles basales.

Las variaciones de las Unidades Arbitrarias se representan en el **Gráfico N° 04**.

Gráfico N° 04

Variaciones de las Unidades Arbitrarias en ratas albinas hembras. (UA)



NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentiana alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

1.3 Momento de la Cola Olive (MCO)

a) El análisis estadístico del Momento de la Cola Olive en ratas albinas machos tratados con los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., se presentan en la **Tabla N° 03. (Anexo N° 13)**

- * El valor promedio del Momento de la Cola Olive fue mayor con Peróxido de Hidrógeno 1% con $11,85 \pm 2,09$; mientras que con Ciclofosfamida 50 mg/Kg., fue de $10,29 \pm 1,17$.
- * Los promedios del Momento de la Cola Olive a dosis de 1000 mg/Kg., fue de $0,44 \pm 0,15$ para el extracto de *Uncaria guianensis*, seguido de $0,34 \pm 0,07$ en *Gentianella alborosea* y $0,25 \pm 0,24$ con *Uncaria tomentosa*.
- * Los promedios del Momento de la Cola Olive a dosis de 2000 mg/Kg., fue de $1,19 \pm 0,35$ para el extracto de *Uncaria guianensis*, seguido de $0,68 \pm 0,58$ en *Gentianella alborosea* y $0,35 \pm 0,20$ con *Uncaria tomentosa*.

Tabla N° 03

Valores del Momento de la Cola Olive en ratas albinas machos. (MCO)

Grupo Experimental	Basal X±D	Tratados X±D
NaCl 0,9%	0.04±0.04	0.04±0.05
H ₂ O ₂ 1%	0.02±0.03	11.85±2.09 *
Ciclofosfamida 50 mg/Kg	0.03±0.04	10.29±1.17 *
<i>Gentianella alborosea</i> 1000 mg/Kg	0.05±0.04	0.34±0.07 *
<i>Gentianella alborosea</i> 2000 mg/Kg	0.01±0.01	0.68±0.58 *
<i>Uncaria guianensis</i> 1000 mg/Kg	0.09±0.08	0.44±0.15 *
<i>Uncaria guianensis</i> 2000 mg/Kg	0.04±0.01	1.19±0.35 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 1000 mg/Kg	0.13±0.14	0.25±0.24
<i>Uncaria tomentosa</i> 2000 mg/Kg	0.00±0.00	0.35±0.20 *

X±SD: Promedio ± Desviación estándar

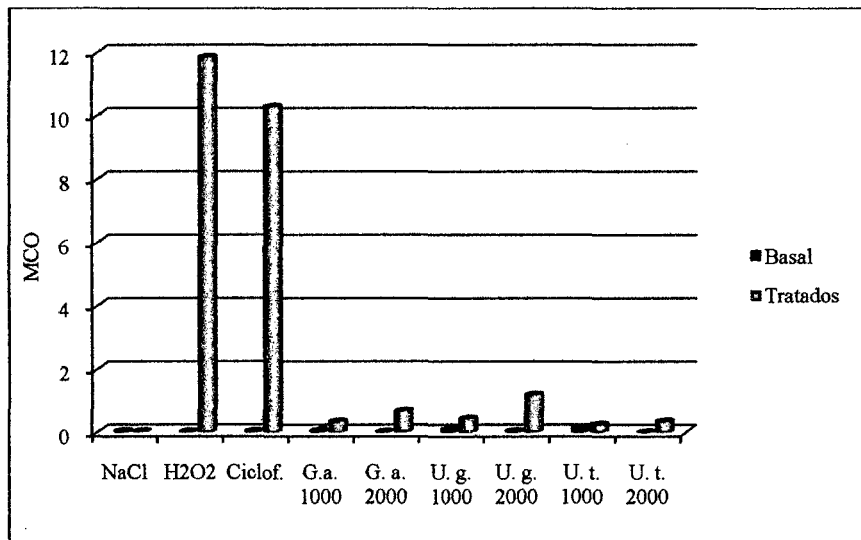
* = $p < 0.05$

En el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en la mayoría de los grupos tratados con los extractos; a excepción del grupo tratado con *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 mg/Kg, cuando se compararon con los datos basales.

Las variaciones del Momento de la Cola Olive se representan en el Gráfico N° 05.

Gráfico N° 05

Variaciones del Momento de la Cola Olive en ratas albinas machos. (MCO)



NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentianella alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

b) El análisis estadístico del Momento de la Cola Olive en ratas albinas hembras tratadas con los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., se presentan en la **Tabla N° 04. (Anexo N° 14)**

- * El promedio del Momento de la Cola Olive fue mayor con Peróxido de Hidrógeno 1% con $11,09 \pm 1,20$; mientras que con Ciclofosfamida 50 mg/Kg., fue de $8,44 \pm 3,00$.
- * Los promedios del Momento de la Cola Olive a dosis de 1000 mg/Kg., fue de $0,40 \pm 0,22$ para el extracto de *Uncaria guianensis*, seguido de $0,39 \pm 0,12$ en *Uncaria tomentosa* y *Gentianella alborosea* con $0,31 \pm 0,21$.
- * Los promedios del Momento de la Cola Olive a dosis de 2000 mg/Kg., fue de $0,70 \pm 0,09$ para el extracto de *Uncaria guianensis*, seguido de $0,66 \pm 0,41$ en *Uncaria tomentosa* y *Gentianella alborosea* con $0,40 \pm 0,06$.

Tabla N° 04

Valores del Momento de la Cola Olive en ratas albinas hembras. (MCO)

Grupo Experimental	Basal X±D	Tratados X±D
NaCl 0,9%	0.06±0.03	0.04±0.01
H₂O₂ 1%	0.06±0.06	11.09±1.20 *
Ciclofosfamida 50 mg/Kg	0.03±0.01	8.44±3.00 *
<i>Gentianella alborosea</i> 1000 mg/Kg	0.12±0.12	0.31±0.21 *
<i>Gentianella alborosea</i> 2000 mg/Kg	0.03±0.02	0.40±0.06 *
<i>Uncaria guianensis</i> 1000 mg/Kg	0.02±0.01	0.40±0.22 *
<i>Uncaria guianensis</i> 2000 mg/Kg	0.05±0.05	0.70±0.09 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 1000 mg/Kg	0.01±0.01	0.39±0.12 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 2000 mg/Kg	0.04±0.07	0.66±0.41 *

X±SD: Promedio ± Desviación estándar

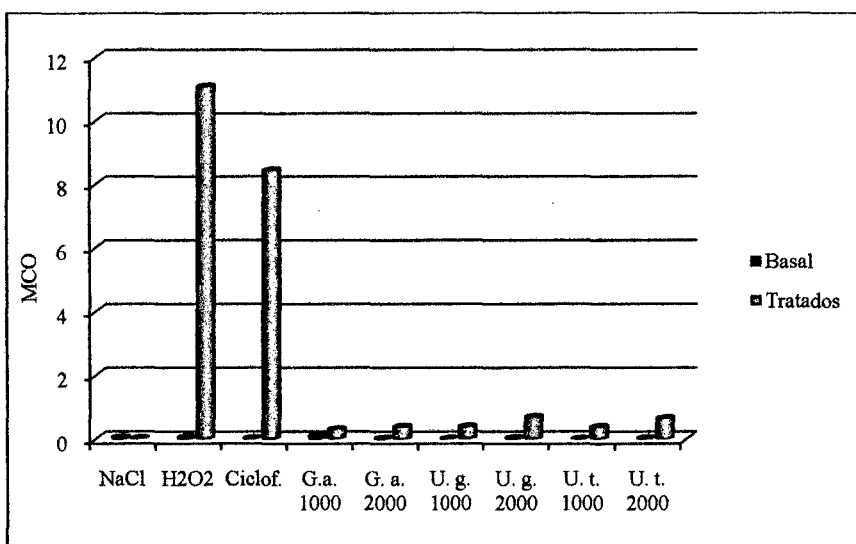
* = $p < 0,05$

En el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los grupos tratados con los extractos, cuando se compararon con los datos basales.

Las variaciones del Momento de la Cola Olive se representan en el **Gráfico N° 06**.

Gráfico N° 06

Variaciones del Momento de la Cola Olive en ratas albinas hembras. (MCO)



NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentianella alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

1.4 Porcentaje de ADN en la cabeza (% ADN cabeza)

a) El análisis estadístico del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas machos tratados con los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., se presenta en la **Tabla N° 05. (Anexo N° 15)**

- * El promedio del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas fue menor en las células tratadas con Peróxido de Hidrógeno 1% con $69,2 \pm 2,70$; mientras que con Ciclofosfamida 50 mg/Kg., fue $71,1 \pm 1,28$.
- * Los promedios del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas a dosis de 1000 mg/Kg., fue menor en *Uncaria guianensis* con $96,8 \pm 1,14$, seguido de *Gentianella alborosea* con $97,6 \pm 0,46$ y *Uncaria tomentosa* con $97,7 \pm 1,96$.
- * Los promedios del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas a dosis de 2000 mg/Kg., fue menor en *Uncaria guianensis* con $92,9 \pm 1,75$, seguido de *Gentianella alborosea* con $95,4 \pm 3,93$ y *Uncaria tomentosa* con $95,6 \pm 2,45$.

Tabla N° 05

Valores del porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas machos. (% ADN cabeza)

Grupo Experimental	Basal X±D	Tratados X±D
NaCl 0,9%	99.8±0.19	99.7±0.32
H ₂ O ₂ 1%	99.9±0.14	69.2±2.70 *
Ciclofosfamida 50 mg/Kg	99.7±0.26	71.1±1.28 *
<i>Gentianella alborosea</i> 1000 mg/Kg	99.6±0.39	97.6±0.46 *
<i>Gentianella alborosea</i> 2000 mg/Kg	99.9±0.09	95.4±3.93 *
<i>Uncaria guianensis</i> 1000 mg/Kg	99.4±0.41	96.8±1.14 *
<i>Uncaria guianensis</i> 2000 mg/Kg	99.6±0.21	92.9±1.75 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 1000 mg/Kg	99.3±0.69	97.7±1.96 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 2000 mg/Kg	99.9±0.09	95.6±2.45 *

X±SD: Promedio ± Desviación estándar

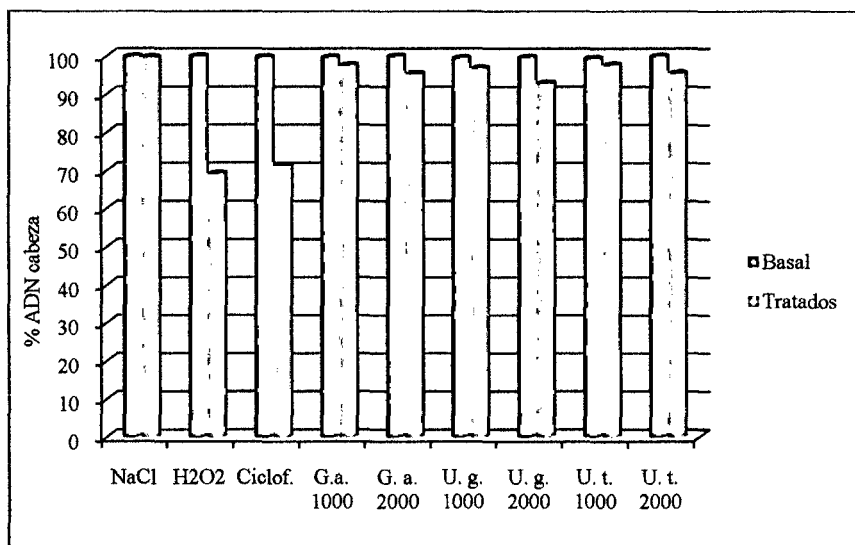
* = $p < 0.05$

En el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los grupos tratados con las sustancias en evaluación, cuando se compararon con los datos basales.

Las variaciones del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas se representan en el Gráfico N° 07.

Gráfico N° 07

Variaciones del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas machos. (% ADN cabeza)



NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentianella alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

b) El análisis estadístico del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas hembras tratadas con los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., se presenta en la **Tabla N° 06. (Anexo N° 16)**

- * El promedio del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas fue menor en las células tratadas con Peróxido de Hidrógeno 1% con $69,9 \pm 2,17$; mientras que con Ciclofosfamida 50 mg/Kg., fue $75,8 \pm 6,14$.
- * Los promedios del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas a dosis de 1000 mg/Kg., fue menor en *Uncaria guianensis* con $95,65 \pm 0,50$, seguido de *Uncaria tomentosa* con $96,4 \pm 0,88$ y *Gentianella alborosea* con $97,4 \pm 1,25$.
- * Los promedios del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas a dosis de 2000 mg/Kg., fue menor en *Uncaria tomentosa* con $94,9 \pm 2,40$, seguido de *Uncaria guianensis* con $95,60 \pm 0,70$ y *Gentianella alborosea* con $96,6 \pm 0,48$.

Tabla N° 06

Valores del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas hembras. (% ADN cabeza)

Grupo Experimental	Basal X±D	Tratados X±D
NaCl 0,9%	99.6±0.17	99.4±0.38
H₂O₂ 1%	99.5±0.24	69.9±2.17 *
Ciclofosfamida 50 mg/Kg	99.2±0.60	75.8±6.14 *
<i>Gentianella alborosea</i> 1000 mg/Kg	99.2±0.81	97.4±1.25 *
<i>Gentianella alborosea</i> 2000 mg/Kg	99.7±0.14	96.6±0.48 *
<i>Uncaria guianensis</i> 1000 mg/Kg	99.7±0.18	95.6±0.50 *
<i>Uncaria guianensis</i> 2000 mg/Kg	99.6±0.46	95.6±0.70 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 1000 mg/Kg	99.6±0.57	96.4±0.88 *
<i>Uncaria tomentosa</i> 2000 mg/Kg	99.7±0.25	95.0±2.40 *

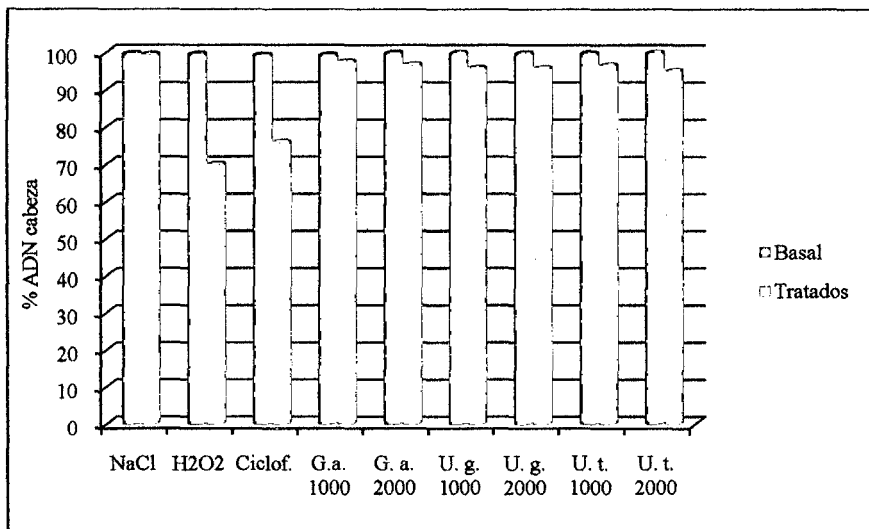
X±SD: Promedio ± Desviación estándar

* = $p < 0,05$

En el análisis de varianza se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los grupos tratados con las sustancias en evaluación, cuando se compararon con los datos basales.

Las variaciones del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas se representan en el **Gráfico N° 08**.

Gráfico N° 08
Variaciones del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas
en ratas albinas hembras. (% ADN cabeza)



NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentianella alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

II. DISCUSIÓN

El presente trabajo muestra los resultados de una evaluación genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea* “Hercampuri”, *Uncaria guianensis* “Uña de gato o gavián” y *Uncaria tomentosa* “Uña de gato”, en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann de ambos sexos; mediante la técnica del Ensayo Cometa.

Mosberg & Hayes (1989), plantearon que los datos referentes al peso corporal y al consumo de alimentos, poseen una gran sensibilidad para detectar alteraciones debidas a productos químicos de baja toxicidad. ⁽⁹⁰⁾

Al final de la evaluación, no se registraron variaciones significativas en los valores del peso corporal de los animales de experimentación tras la administración por vía oral durante cinco días, de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg.; contrario a esto, hubo un leve aumento del peso corporal de los mismos. Puesto que los extractos en estudio no tuvieron un efecto deletéreo sobre el consumo de agua y alimentos en los animales de experimentación utilizados en esta evaluación.

La genotoxicidad es el resultado de la interacción de agentes químicos o físicos con el material hereditario de la célula (ADN), y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número o estructura de los cromosomas. ⁽⁹¹⁾ Existen diversos ensayos que detectan el daño al ADN, siendo uno de ellos el Ensayo Cometa; es un método sensible y rápido, capaz de detectar variedades de lesiones que pueden ocurrir en el ADN de células individuales. ⁽⁹²⁾ También, es capaz de estimar el aumento en el nivel de fragmentaciones en el ADN ⁽⁹³⁾ de células eucarióticas individuales de cualquier organismo, como resultado de la exposición a sustancias genotóxicas, radiaciones UV y daño oxidativo. ^(94, 95, 96, 97)

Se encontraron diferencias en los valores de los controles positivos utilizados, dicha diferencia puede deberse a que las células fueron expuestas directamente al Peróxido de Hidrógeno 1%, asegurando así la aparición del efecto genotóxico. Se presume que los valores obtenidos con la Ciclofosfamida 50 mg/Kg., fueron porque tuvo que pasar por el

proceso de toxicocinética (absorción, distribución y metabolismo) para poder ejercer su efecto genotóxico.

El máximo valor de unidades arbitrarias obtenido de los extractos en estudio fue a dosis de 2000 mg/Kg., con el extracto acuoso liofilizado de *Uncaria guianensis* con $91 \pm 11,35$, seguido de *Gentianella alborosea* con $82 \pm 16,68$ y *Uncaria tomentosa* con $82 \pm 6,90$.

En todos los grupos tratados, tanto en la dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en los valores de Unidades Arbitrarias; al ser comparados con sus respectivos controles basales y con el control de negativo de NaCl 0.9 %.

Sin embargo, al ser comparados con los controles positivos no reflejaron valores de Unidades Arbitrarias que hagan presumir una elevada genotoxicidad. En contraste, según Collins (2004) ⁽⁹⁷⁾ donde indica que 400 Unidades Arbitrarias representan células completamente dañadas. Por lo mencionado, los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg. son considerados con una baja tendencia genotóxica sobre los linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann de ambos sexos.

La baja tendencia genotóxica de los extractos en estudio puede deberse a que contienen polifenoles, los cuales captan los radicales libres y protegen al ADN. ⁽⁹⁸⁾ Cabe mencionar que este posible efecto genotóxico puede ser reversible, puesto que el ADN tiene una capacidad regeneratoria gracias a sus enzimas de reparación (O⁶-metilguanina-ADN metiltransferasa, ADN fotoliasas, endonucleasa UvrABC, endonucleasa AP, ADN polimerasa I y la Ligasa). ⁽⁹⁹⁾

En el análisis de los cometas a través de medición de imágenes, son dos las variables que mayormente se utilizan: El Momento de la Cola Olive y El Porcentaje de ADN en la cabeza. El Momento de la Cola Olive (MCO) es utilizado como un indicador de daño al ADN en el ensayo cometa. ⁽¹⁰⁰⁾

Los máximos valores del MCO obtenidos por los tres extractos en estudio fue a dosis de 2000 mg/Kg., siendo $1,19 \pm 0,35$ en *Uncaria guianensis*, seguido de $0,68 \pm 0,58$ para *Gentianella alborosea* y finalmente $0,66 \pm 0,41$ con *Uncaria tomentosa*. Se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) en todos los grupos de las dosis de 1000 y

2000 mg/Kg.; al ser analizados con los controles basales y con el control negativo de NaCl 0.9%. Al contrastar los valores obtenidos del MCO de los extractos con los controles positivos, se observó que la tendencia genotóxica fue baja.

Aún así, el máximo valor obtenido con *Uncaria guianensis* sugiere que dicho extracto no produjo un daño considerable al ADN, puesto que el valor es bajo e indica la poca presencia de ADN en la cola del cometa.

Dicha afirmación puede ser comparada con el trabajo realizado por Soler *et al* (2006)⁽¹⁰¹⁾, quien evaluó el efecto de agua de mar en humanos. En los resultados de genotoxicidad sobre linfocitos con el Ensayo Cometa, obtuvieron un aumento leve pero significativo de los valores del MCO (0.78 a 1.98, $p=0.0005$); no encontrando alteraciones patológicas y estos valores se encuentran normales.

Hughes (1998)⁽¹⁰²⁾, indica que el porcentaje de ADN en la cabeza se ha utilizado por diferentes autores para evaluar el efecto protector de diferentes sustancias sobre el ADN.

El mínimo valor del Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas a dosis de 2000 mg/Kg., fue con el extracto de *Uncaria guianensis* con $92,9\pm 1,75$; seguido de *Uncaria tomentosa* con $94,9\pm 2,40$ y *Gentianella alborosea* con $95,4\pm 3,93$. Se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) en las dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., al ser comparados con los controles basales y con el control negativo de NaCl 0.9%.

Estos valores, del Porcentaje de ADN en la cabeza; obtenidos con los extractos en estudio no fueron semejantes o menores al ser comparados con los controles positivos de Ciclofosfamida 50 mg/Kg., y Peróxido de Hidrógeno 1%.

La disminución del ADN en la cabeza de los cometas puede deberse a las rupturas de simple cadena, que son el resultado de diferentes tipos de reacciones que incluyen: reparación por escisión de bases y nucleótidos, roturas producidas por el ataque de un compuesto químico o radiaciones, escisión seguida de la unión de agentes intercalantes, acción de las endonucleasas o topoisomerasas y la acción de hidrolasas.⁽⁸³⁾ Durante la reparación por escisión de bases y nucleótidos se generan rupturas, que pueden ser también causa de la migración del ADN en el ensayo cometa.⁽¹⁰³⁾

Los resultados de la baja genotoxicidad obtenidos mediante el ensayo cometa pueden ser comparados con los resultados de otras evaluaciones genotóxicas realizadas a *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa*.

Como los obtenidos por Almeida y Chávez (2009) ⁽²²⁾, quienes determinaron que el extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Gentianella alborosea*, a dosis de 1600 mg/Kg., en células germinales mediante el ensayo *in vivo* de anomalías en la cabeza de espermatozoides de ratón; no presentó espermatozoides anormales en relación al control positivo de Ciclofosfamida 40 mg/Kg.

Gonzales & Pinedo (2008), también evaluaron el potencial genotóxico de las hojas de *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., mediante el ensayo de inducción de anomalías en la cabeza de espermatozoide de ratón. Concluyeron que *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* no presentaron potencial genotóxico en ninguna de las dosis evaluadas ya que no hubo mayor presencia de espermatozoides con cabezas anormales. ⁽³¹⁾

La corteza de *Uncaria tomentosa* fue evaluada por Mestanza *et al.* (2000) mediante el ensayo de *in vivo* de inducción de micronúcleos en médula ósea de ratón a dosis de 2000, 1000 y 500 mg/Kg., por vía oral. En la prueba realizada no detectaron daño citotóxico ni la ocurrencia de efectos genotóxicos. ⁽⁴¹⁾

Todos estos resultados conllevan a resaltar la baja tendencia genotóxica de estos extractos; y su capacidad de producir, o no producir daño al ADN, ya sea de linfocitos, eritrocitos o espermatozoides.

Porque la aparición del efecto genotóxico dependerá de la concentración y tiempo de exposición al xenobiótico para la posterior manifestación del daño ocasionado. ⁽¹⁰⁴⁾

III. CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., no son genotóxicos mediante el método visual del ensayo cometa en los linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann.
2. Los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* no producen genotoxicidad a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., en relación al momento de la cola olive de los cometas en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann.
3. Los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* no son genotóxicos a dosis de 1000 y 2000 mg/Kg., porque no disminuyen considerablemente el porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzmann.
4. El extracto con posible efecto genotóxico fue el extracto de *Uncaria guianensis* a dosis de 2000 mg/Kg., al ser comparado con los controles positivos; seguido por *Gentianella alborosea* y *Uncaria tomentosa* administrados a dosis de 2000 mg/Kg., a ratas albinas cepa Holtzmann.

IV. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de genotoxicidad con *Gentianella alborosea* y *Uncaria guianensis*, como el ensayo de inducción de micronúcleos, aberraciones cromosómicas.
2. Evaluar otras células con el ensayo cometa, como espermatozoides, óvulos, hepatocitos, etc., con estas tres especies medicinales.
3. Realizar más evaluaciones genotóxicas de estas especies vegetales después de una exposición crónica.
4. Llevar a cabo estudios complementarios a los ensayos de genotoxicidad, como el secuenciamiento del ADN con la técnica del PCR; con la finalidad de saber qué pares de bases son afectados en el ADN por estas plantas o cualquier otra sustancia.

CAPÍTULO V

I. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guzmán GY. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana: Estudio de su uso y cultivo. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP). Diciembre, 1997. Disponible en URL: <http://www.iiap.org.pe/publicaciones/CDs/plantas%20medicinales/iiap2/Presentacion.htm>
2. Sánchez LA, Cápiro TN; Fonseca LG. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de las propiedades genotóxicas de la especie endémica *Phyllanthus orbicularis* HBK. Rev. Cuba. Invest. Bioméd. 1999; 18(1):16-18.
3. Cultivos de los Incas: Plantas Medicinales – Perú Ecológico. Disponible en URL: <http://www.peruecologico.com.pe/medicinales.htm>
4. Dourojeanni MJ. *Amazonía ¿qué hacer?* Iquitos (Perú): Centro de Estudios Teológicos de la Amazonía. 1990; 374.
5. Roersch C. Plantas Medicinales en el sur Andino del Perú. Centro de Medicina Andina. Cusco-Perú; 1994; 2: 907-10.
6. Pinedo M, Rengifo E, Cerruti T. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana. Estudio de su uso y cultivo. AECI. IIAP. GRL. Iquitos-Perú. 1997; 304.
7. Wall M., Wani M. Antimutagenic agents from natural products of terrestrial and marine origin. En: Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms, III Edited by G Bronzetti *et al*, Plenum press, New York. 1993; 87-97.
8. Alice C, Vargas V, Silva G, De Siqueira N, Schapoval E, Gleve J, Henriques A. Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. Journal of Ethnopharmacology. 1991; 35, 165-171.
9. Kramer PJ. Genetic toxicology. J-Pharm-Pharmacol. 1999; 4. 395-405.
10. Kao FT, Puck TT. Genetics of somatic mammalian cells VII. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1968; 60:1275-81.
11. Au WW, Walker DM, Ward JBJ, Whorton E, Legator MS, Singh V. Factors contributing to chromosome damage in lymphocytes of cigarette smokers. Mutat Res. 1991; 260:137-44.
12. Ramalho AT, Sinjevaric I, Natarajan AT. Use of the frequency of micronuclei as quantitative indicator of X ray induced chromosomal aberration in human

- peripheral blood lymphocytes. Comparison of two methods. *Mutat Res* 1988; 207:141-6.
13. Kawahara N, Nozawa M, Flores D, Bonilla P, Sekita S, Satake M. Sesterterpenoid from *Gentianella alborosea*. *Phytochemistry*. 2000; 53 (8): 881-4.
 14. Castro LA, Choquesillo PF, Félix VL, Milla FH, Bell CC, Castro EN, Palomino DLGR., Armas TS, Ramos CN, Calderón TA. Investigación de metabolitos secundarios en plantas medicinales con efecto hipoglicemiante y determinación del cromo como factor de tolerancia a la glucosa. *Ciencia e investigación*. 2002; 5: 1.
 15. Acero N, Llinares F, Galán de Mera A, Oltra B, Muñoz Mingarro D. Apoptotic and free radical scavenging properties of the methanolic extract of *Gentianella alborosea*. *Epub*. 2006; 77 (6): 475-7.
 16. Llanos WC, Llamoca MP. Efectos de decocto de *Gentianella alborosea* en *Oryctolagus cuniculus* con hiperlipidemia inducida. [Tesis Bach. Farmacia] Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo - Perú. 1995.
 17. Cortijo PM, Rodríguez SP. Efecto diurético del infuso de *Gentianella alborosea* en *Rattus rattus* var. *Albinus* y su comparación de Furosemida e Hidroclorotiazida. [Tesis Bach.] Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia. Trujillo - Perú. 1998
 18. Sánchez Z. Hercampuri *Gentianella alborosea*. *Natura Medicatrix*. España. 1999; 52: 44-5.
 19. Hercampuri / *Gentianella alborosea*. [Hersil S.A. Laboratorios Industriales Farmacéuticos]. Lima - Perú. Disponible en: <http://www.hersil.com.pe/Cont3/pdf/hercampuri.pdf>
 20. Ríos IF. Toxicidad aguda oral del extracto acuoso liofilizado de *Gentianella alborosea* (Gilg) Fabris “Hercampuri” en animales de experimentación. Instituto de Medicina Tradicional – Essalud. Iquitos – Perú. 2008.
 21. Herrera BDM, Huarsaya ALM. Evaluación del potencial toxicológico del extracto acuoso liofilizado de *Gentianella alborosea* (Gilg) Fabris “Hercampuri” en animales de experimentación. [Tesis de Grado] Universidad Católica de Santa María de Arequipa. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Arequipa – Perú. 2008.

22. Almeida ASO, Rodríguez CE. Evaluación del potencial genotóxico de cinco especies medicinales en el Perú. [Tesis de Grado] Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Iquitos – Perú. 2009.
23. Hemingway SR, Phillipson JD. Alkaloids from S. American species of *Uncaria* (Rubiaceae). J. Pharm. Pharmacol. 1974; 26: 113
24. Yépez AM, De Ugaz OL, Alvarez CM, De Feo V, Aquino R, De Simone F, Pizza C. Quinovic acid glycosides from *Uncaria guianensis*. Phytochemistry. 1991; 30 (5): 1635-7.
25. Carvalho MV, Penido C, Siani AC, Valente LM, Henriques MG. Investigations on the anti-inflammatory and anti-allergic activities of the leaves of *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. Inflammopharmacology. 2006; 14 (1-2): 48-56.
26. Correia AF, Segovia JF, Gonçalves MC, de Oliveira VL, Silveira D, Carvalho JC, Kanzaki LI. Amazonian plant crude extracts screening for activity against multidrug-resistant bacteria. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2008; 12 (6): 369-80.
27. Encinas P., Vásquez L. Estudio de la actividad antiulcerosa de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. y *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. en ratas albinas. [Tesis de Grado] Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Iquitos – Perú. 2008.
28. Ríos *et al.* Determinación de la Toxicidad Aguda oral por el método de Clases Tóxicas Agudas del extracto acuoso liofilizado de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. Instituto de Medicina Tradicional - EsSalud. Iquitos – Perú. 2006.
29. Ríos IF, Betancourt BJE, Gorriti GA Evaluación de la toxicidad aguda oral del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. Instituto de Medicina Tradicional - Essalud. Iquitos – Perú. 2006.
30. Tenazona WDV. Evaluación toxicológica a dosis repetida por 90 días del extracto liofilizado de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel. en ratas albinas – Instituto de Medicina Tradicional – EsSalud – Iquitos – 2006. [Tesis de Grado] Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Iquitos – Perú. 2006.
31. Gonzales GP, Pinedo LMN. Evaluación genotóxica de extractos acuosos liofilizados de tres vegetales de la región Loreto en células germinales del ratón. [Tesis de Grado]. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Facultad de Ciencias Biológicas. Iquitos - Perú. 2008.

32. Senatore A, Cataldo A, Iaccarino FP, Elberti MG. Phytochemical and biological study of *Uncaria tomentosa*. Bulletin de la Société Italienne de Pharmacie. 1989; 65:517-520.
33. Aquino R, De Simone F, Vicieri F, Pizza C. New Polyhydroxylated Triterpenes from *Uncaria tomentosa*. Jour. Nat. Prod. 1990; 53: 559 - 564.
34. Laus G, Brossner D, Keplinger K. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. Phytochemistry 1997, 45(4):855-860.
35. Gonçalves C, Dinis T, Batista MT. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. Phytochemistry. 2005; 66 (1): 89-98.
36. Ccahuana VRA, Santos SS, Koga-Ito CY, Jorge AO. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. Braz. Oral Res. 2007; 21(1):46-50.
37. Cosentino C, Torres L. Reversible worsening of Parkinson disease motor symptoms after oral intake of *Uncaria tomentosa* (cat's claw). Clin Neuropharmacol. 2008; 31(5): 293-4.
38. Rizzi RR, Bianchi FA, De Feo V, De Simone, Bianchi FL, Stivala LA. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa*. Journal of Ethnopharmacology. 1993; 38: 63-77.
39. Silva H, Ríos F, García J, Cerruti T, Nina E. Toxicidad aguda de 12 especies vegetales de la Amazonía peruana con propiedades medicinales. Instituto de Medicina Tradicional - IPSS. Iquitos - Perú. 1997.
40. Ríos IF. Toxicidad aguda de 10 especies vegetales con propiedades medicinales. Biodiversidad y Salud. Rev. Amaz. Invest. Cient. IPSS. Vol. 1 N° 1. Iquitos-Perú. 1998.
41. Mestanza DM, Nonato RL, Ríos IF. Genotoxicidad del extracto acuoso liofilizado de la corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. Departamento de Farmacología y Toxicología. Instituto de Medicina Tradicional - EsSalud. 2000; 2 (1): 6-8.
42. Paniagua PR, Madrigal BE, Reyes CS, Pérez GJ, Mota MP. Estudio del Potencial Genotóxico del Oxindol y Beta-Sitosterol en Médula Ósea de Ratón. Departamento de Toxicología. Rev. Mex. Med. Fís. y Reh. 2000; 12: 72.

43. Romero JM, Campos SJ, Analla M, Muñoz SA, Moraga AA. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat Res.* 2005; 585 (1-2): 147-55.
44. Delgado WHV, Riquelme PMA. Estudio del potencial toxicológico a dosis repetidas durante 90 días de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. en *Rattus norvegicus* cepa Holtzmann. Iquitos – 2007. [Tesis de Grado] Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Iquitos – Perú. 2007
45. Cruz FAS. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas de 90 días del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. en ratas albinas cepa Holtzmann, Iquitos – 2007. [Tesis de Grado] Universidad Nacional de la Amazonia Peruana. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Iquitos – Perú. 2007.
46. Chin WJL; Vásquez OP; Monge MA; Moreno MM. Efecto de *Uncaria tomentosa* en la mutagénesis de *Salmonella typhimurium* inducida por 7,12 dimetilbenzantraceno con activación metabólica *in vitro*. Hospital Ángeles del Pedregal México D.F. México. 2008.
47. Paniagua PR, Madrigal BE, Molina JD, Reyes CS, Álvarez GI, Sánchez CL, Pérez GJ. Antigenotoxic, antioxidant and lymphocyte induction effects produced by pteropodine. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2009; 104 (3): 222-7.
48. Pereira FM, Souza DS, Leite MF, Maistro EL. Investigación do potencial genotóxico do extrato de *Tamarindus indica* em células do fígado e de sangue periférico de ratos wistar. I Simpósio de Pesquisa e V SEMIC – Seminário de Iniciação Científica da UNIFENAS. 2006.
49. Bruges K, Reguero R. Evaluación preliminar de toxicidad, genotoxicidad y actividad antimicrobiana de *Sida rhombifolia* L. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 2007; 91: 5-13.
50. Alvis R, Francia J, Gonzales J, Pino J, Shiga B. Evaluación del efecto protector del “camu camu” (*Myrciaria dubia* H.B.K. MC Vaugh) en tres tipos celulares expuestos *in vivo* a Bromato de potasio (KBrO₃), mediante el “Ensayo cometa”. XVII RC ICBAR. 2008; 81.
51. Castedo JP. Infusiones de hierbas – Extractos. Santa Cruz Bolivia. Disponible en URL: <http://ccbolgroup.com/hierbas2.html>
52. Hercampuri: Té Inca contra el colesterol y la diabetes. Disponible en URL: <http://www.viviendonatural.com/?s=hercampuri&submit.x=0&submit.y=0>

53. El Hercampuri. Yerba Sana. Disponible en URL: <http://yerbasana.cl/?a=3093>
54. Cronquist, A. The Evolution and classification of flowering plants. 2nd edition. The New York botanical garden. 1998.
55. Hercampuri. *Gentianella alborosea*. Disponible en URL: <http://www.ptnsa.com/hercampuri.php>
56. Brack A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Ed. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. 1999; 222.
57. Vargas L, Vargas R, Naccarato P. Guía de medicina natural para la salud de la Mujer. Ed. Grafico Bellido. Lima - Perú; 1995; 35.
58. Kawaharan N, Nozawa M, Flores D, Bonilla P, Sekita S, Satake M. Chemical components of peruvian Fol. Medicine “Hercampuri” (*Gentianella alborosea*). En: III Congreso Nacional de Ciencia Farmacéuticas y bioquímicas. Lima – Perú 1996; 33: 146,150.
59. Brako L, Zaruchi J. Catalogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. Editorial Missouri Botanical Garden. 1993; 43.
60. Productos Naturales Schuler. “Uña de gato” Disponible en URL: <http://www.schuler.com.pe/fichauna.htm>
61. Vásquez J, Mejía K, Couturier G. Insectos de la “Uña de gato” (*Uncaria guianensis* y *U. tomentosa*: Rubiaceae), Planta medicinal de la Amazonía peruana. Rev. Per. Ent. 1996; 39: 121-124.
62. Steyermark J. Flora de: Rubiaceae. Vol. IX. Primera parte. 1974; 593.
63. Mejía K, Rengifo E. Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana. Segunda Edición. Editorial Asociación Gráfica Educativa. Lima - Perú. 2000; 33.
64. Lock de Ugaz O, Callo N. La “Uña de gato”: su estudio científico. Rev. Quím. 1991; 5: 47-53.
65. Lavault M, Moretti C. Alcaloides de *Uncaria guianensis*. Planta médica. 1983; 47: 244 – 245.
66. Mejía K. y colaboradores. Plantas Medicinales de uso popular en la Amazonía Peruana. AECI – IIAP. Iquitos – Perú. 1995.
67. Obregon L. Uña de gato: *Uncaria*. Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. Instituto de Fitoterapia Americano. Lima - Perú. 1994; 162.

68. Alvarez C, Sanchez O, Stilke R, Lock de Ugaz O. Algunos constituyentes de *Uncaria guianensis*. Rev. Quím. PUCP. 1988; 2: 99-104.
69. Yepez A, Lock de Ugaz O, Alvarez C, De Feo V, Auino R, De Simone F, Pizza C. Quinovic acid glycosides from *Uncaria guianensis*. Phytochem. 1991; 30: 1635-1637.
70. Montesinos F, Fuentes F. Aspectos Físico - Químico, Farmacológico y Terapéutico de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. “Uña de gato. Boletín de la Sociedad Química del Perú. Volumen LXI, Marzo 1995; 55-65.
71. López Luengo MT. “Uña de gato” Características y perfil terapéutico. Ámbito Farmacéutico – Fitoterapia. 2006; 25: 10.
72. Silbergeld Ellen K. Toxicología – Herramientas y Enfoques. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Disponible en URL: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/33.pdf>
73. Díaz RE. Glosario del Cáncer. Hospital Clínico San Carlos, Madrid. España. Depósito legal: B-39.380-2007. 2007; 43.
74. Gómez MBC, Zúñiga GGM. Genotoxicidad y Potencial Teratógeno. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana. 2007; 10: 3. Disponible en URL:
75. D’Ocon NC, García GS, Vicente GJ. Fundamentos y Técnicas de Análisis Bioquímico. Principios de Análisis Instrumental. Editorial Paraninfo. 1999. Pág. 110
76. Laffon B. *et al.* Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del Estireno. An. R. Acad. Nac. Farm. 2004; 70: 95-123.
77. Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochem. Biophys. Res. Comun. 1984; 123: 291-298.
78. Di Giorgio M, Taja MR, Nasazzi NB, Bustos N, Cavalieri H, Bolgiani A. El ensayo de cometa como herramienta de la dosimetría biológica en la evaluación de sobreexposiciones fuertemente localizadas. En: 5th Regional Congress on Radiation Protection and Safety. Recife – Brasil. 29 de Abril al 4 de Mayo 2001.
79. Álvarez C, Ochoa S, Ayala N, Andrade M, Reynoso M. Mutagénesis. Universidad de Guadalajara. 2003.

80. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of ADN damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988; 175(1):184-191.
81. Betancourt BJE. Cuestiones éticas en la experimentación animal. DOC; 1999.
82. Sotil G, Alvis R, Francia JC, Shiga B. Aplicación de dos biomarcadores para el análisis de lesiones en el DNA de bivalvos marinos. *Rev. peru. biol.* 2007; 13(3): 249-253.
83. Horváthová E, Slameňová D, Hlinčíková L, Kumar T, Gábelová A, Collins AR. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research.* 1998; 409: 163-171.
84. Trittek Corp. Comet Score TM [Software informático]. Versión 1.5. Disponible en URL: www.autocomet.com
85. Minter BA, Collins JP. Ecological ethics: building a new tool kit for ecologists and biodiversity managers. *Conservation Biology* 2005; 19(6): 1803-1812.
86. ILAR, NRC. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington, D.C.: National Academic Press; 1996.
87. Russell WMS, Burch RL. The Principles of Humane Experimental Technique en 1959 and The Three R's: The Way Forward. J. Zurlo, D. Rudacille, and A. M. Goldberg. *Environmental Health Perspectives* 1996; 104(8).
88. González F, De la Peña R. Lineamientos Generales para la elaboración del Reglamento y las Normas de trabajo en los Vivarios Experimentales de los Institutos y Facultades de Ciencias Médicas. La Habana: Centro Nac. de Perfeccionamiento Médico y Medios Audiovisuales, Minsap eds.; 1988.
89. Pardo CA. Ética de la experimentación animal. Directrices legales y éticas contemporáneas. *Cuad. Bioét.* 2005; 16: 3.
90. Mosberg AT, Hayes WA. Subchronic Toxicity Testing. 1989.
91. Clayson, DB, Grant DL. The assessment of mutagenicity. Health protection branch mutagenicity guidelines. *Environmental and Molecular Mutagenesis.* 1992; 21:15-37.
92. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu, JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 2000; 35: 206-221.

93. Gadik CME, Collins AR. Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *International Journal of Radiation Biology*. 1992; 62: 313-320.
94. Steinert SA, Streib-Montee R, Leather JM, Chadwick DB. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research*. 1998; 399: 65-85.
95. Steinert SA, Streib R, Sastre MP. Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*. 1998; 46(1-5): 355-358.
96. Cotelle S, Ferard JF. Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1999; 34: 246-255.
97. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*. 2004; 26: 249-26.
98. Pedrola IE. Polifenoles y sus propiedades antioxidantes. Disponible en URL: <http://www.dietcan.net/docs/polifenoles-mad.pdf>
99. Vásquez CE. Reparación al ADN. *Bioquímica y Biología Molecular en Línea*. Instituto de Química – Universidad Nacional Autónoma de México. 2003. Disponible en URL: <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/reparacion%20dna.html>
100. Mohammad A, Yearul K, Faizule H, Zaved WTM, Md. Hoque ME, Shafiqur R. Increased DNA damage in blood cells of rat treated with lead as assessed by comet assay. *Bangladesh J Pharmacol* 2008; 3: 97-101
101. Soler TW, Pérez GJA, Penagos GLE, Osorio SG, Velásquez ENC, Henao CJA. *et al.* Investigación sobre el efecto del consumo de agua de mar en humanos. En: VII Encuentro Internacional del agua de mar. Usos nutricionales y terapéuticos. Agosto 2006.
102. Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W. The effects of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum Reprod* 1998; 13: 1240-1247. Erratum in: *Hum Reprod* 1998; 13: 3284.
103. Tice R. The single cell gel/Comet assay: a microgel electrophoretic technique for detection of DNA damage and repair in individual cells. *Environmental Mutagenesis*. 1995; 13:15-39,

104. Yu Z, Chen J, Ford BN, Brackley ME, Glickman BW. Human DNA Repair Systems: An Overview. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1999; 33:3-20.

II. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- ✓ **Aberración cromosómica:** Anormalidad en el número o en la estructura de los cromosomas.
- ✓ **Ácido desoxirribonucleico (ADN).** Molécula compleja, integrante de los cromosomas, que almacena la información hereditaria en forma de variaciones (con características de código) en la secuencia de las bases de purina y pirimidina; esta información se traduce en la síntesis de las proteínas, por lo que es determinante de todas las características físicas y funcionales de las células y del organismo.
- ✓ **Alcaloide.** Compuesto de origen vegetal, con uno o más átomos de nitrógeno que le confieren carácter de base orgánica. También hay sintéticos y producidos a partir de proteína.
- ✓ **Apoptosis.** Proceso fisiológico previsto de muerte y desintegración de tejidos dentro del desarrollo normal de los seres vivos.
- ✓ **Concentración.** Cantidad de una sustancia, expresada en peso o en moles (S), por unidad de peso o volumen del medio en que se encuentra ($C=S/Kg$; $C=S/L$). Puede expresarse como porcentaje (riqueza).
- ✓ **Control, grupo :** Grupo seleccionado o establecido necesariamente antes de un estudio, integrado por humanos, animales, células, etc., en todo idéntico al grupo que se estudia, y mantenido en la misma situación y condiciones que éste, pero sin someterlo a la exposición.
- ✓ **Cromosoma.** Estructura autorreplicante formada por ADN complejo con proteínas, implicada en el almacenamiento y transmisión de la información genética; la estructura física que contiene los genes.
- ✓ **Cuarentena:** Período de aislamiento impuesto a un ser vivo u objeto que proviene de un lugar lejano por cuarenta días.
- ✓ **Dislocación cervical:** Acción o efecto de separar el cráneo de la columna vertebral.

- ✓ **Dosificación:** Expresión de la dosis que recibe un individuo, en función del tiempo; por ej., mg/Kg/hora; mg/Kg/día.
- ✓ **Dosis:** Cantidad de sustancia administrada o absorbida por un individuo en proporción a su peso o volumen corporal, ordinariamente en 24 horas. Se suele expresar en mg/Kg.
- ✓ **Dosis letal media (DL₅₀):** Nivel en el cual una simple dosis causa la muerte en la mitad de los animales utilizados en el estudio.
- ✓ **Dosis tóxica:** Aquella cantidad de una sustancia capaz de manifestar un efecto tóxico.
- ✓ **Efecto:** Cualquier cambio producido por una sustancia química sobre un sistema biológico concreto.
- ✓ **Ensayo de toxicidad:** Estudio experimental de los efectos adversos de una sustancia sobre un organismo vivo, durante un tiempo determinado y condiciones definidas. Término relacionado: ensayos de toxicidad aguda, ensayos de toxicidad crónica, ensayos de carcinogenicidad.
- ✓ **Exposición:** Situación que hace posible la penetración o absorción de una sustancia tóxica por un organismo vivo.
- ✓ **Fenotipo.** Características observables de un organismo, estructurales y funcionales, determinadas por el genotipo y moduladas por el ambiente.
- ✓ **Genotipo.** Composición alélica específica de una célula bien referida al total del genoma o, más comúnmente, a un gen o conjunto de genes.
- ✓ **Genotoxicidad.** Capacidad para causar daño al material genético; el daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno.
- ✓ **in vitro.** Literalmente, en vidrio. Estudio de laboratorio realizado sobre células, tejidos u órganos aislados o con sistemas subcelulares o bioquímicos (enzimas).
- ✓ **in vivo:** Estudio realizado sobre un organismo vivo.

- ✓ **Linfocito.** Célula sanguínea, del grupo de los leucocitos, capaz de sensibilizarse y desarrollar una respuesta inmunitaria; hay dos tipos de linfocitos: T y B.
- ✓ **Liofilización:** Proceso físico de secado o deshidratación a baja presión y temperatura.
- ✓ **Toxicidad.** Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.
- ✓ **Toxicidad aguda.** Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente hasta 14 d) después de la administración de una dosis única (o una exposición dada) o tras dosis o exposiciones múltiples en 24 h.
- ✓ **Toxicidad Crónica:** Se refiere a los efectos de salud a largo plazo, que ocurren o persisten después de una exposición repetida a una sustancia tóxica (meses o años). Usualmente esto se refiere a una baja dosis de exposición.
- ✓ **Tóxico:** Cualquier agente químico, físico o biológico capaz de producir efectos biológicos adversos y posiblemente dañinos.
- ✓ **Toxicocinética.** Expresión en términos matemáticos de los procesos que experimenta una sustancia tóxica en su tránsito por el cuerpo (captación, absorción, distribución, biotransformación y eliminación).
- ✓ **Toxicodinámica.** Proceso de interacción de una sustancia tóxica con los lugares diana, y las consecuencias bioquímicas y fisiopatológicas que conducen a los efectos tóxicos.
- ✓ **Xenobiótico:** Cualquier agente exógeno que interactúa con un organismo.

III. ANEXOS

ANEXO N° 01: Certificado de salud de los animales de experimentación emitido por
el Instituto Nacional de Salud

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS
BIOTERIO



CERTIFICADO SANITARIO N° 007-2009

Producto	: Ratón albino	Cepa	: Balb/c/CNPB
Especie	: <u>Mus musculus</u>		
Lote N°	: M-03-2009		
Peso	: 22 – 24 gr. (30 a 34 días)	Cantidad	: 410 (300 Machos y 110 Hembras)
Producto	: Rata albina	Cepa	: Holtzman
Especie	: <u>Rattus norvegicus</u>		
Lote N°	: R-01-2009		
Peso	: 100 – 230 gr. (1 mes ½ a 2 meses)	Cantidad	: 620 (300 machos y 320 Hembras)
Factura	: N° 004-015980 GR: 018536		
Fecha	: 12.01.09 16-11-2007 – Cancelado 06.02.2008	Destino	: Seguro Social de Salud ESSALUD - IQUITOS

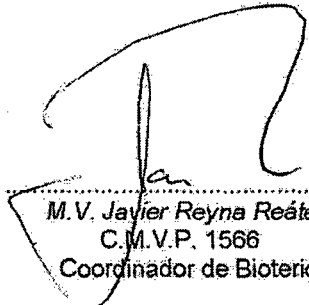
El Médico Veterinario que suscribe, Javier Reyna Reátegui, Coordinador de Bioterio, **CERTIFICA**, que los animales arriba descritos se encuentran en buenas condiciones sanitarias *.

* Referencia : P.R.T.-CNPB-153, Procedimiento para el Ingreso, Cuarentena y Control Sanitario para animales de experimentación.

Chorrillos, 12 de Enero del 2009

(fecha de entrega)

NOTA: El Bioterio no se hace responsable por el estado de los animales, una vez que éstos egresan del mismo.


M.V. Javier Reyna Reátegui.
C.M.V.P. 1566
Coordinador de Bioterio

ANEXO N° 02: Certificado de *Herbarium Amazonense* emitido por la
Universidad Nacional de la Amazonia Peruana



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM AMAZONENSE (AMAZ)
Esquina Pevaa/Nansay - Teléfono 23 6121 - Apartado Postal 326
E-mail herbarium@amaz.com.pe
Iquitos-Perú

CENTRO DE ESTUDIO, INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

CERTIFICADO

EL DIRECTOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA
CERTIFICA:

Que, la muestra botánica colectada por el Bachiller F. BQ. Jorge Pinedo Torres pertenece a su tesis de grado titulada "Evaluación genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis* y *Uncaria tomentosa* en linfocitos de ratas albinas cepa Holtzman", fue verificada e identificada en este Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza, como a continuación se indica:

<u>Familia</u>	<u>Nombre Científico</u>	<u>Nombre Vulgar</u>
GENTIANACEAE	<i>Gentianella alborosea</i> (Gilg) Fabris	"Hercampuri"
RUBIACEAE	<i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) Gmel.	"Uña de gato"
RUBIACEAE	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd. ex Roem. & Schul.) DC.	"Uña de gato"

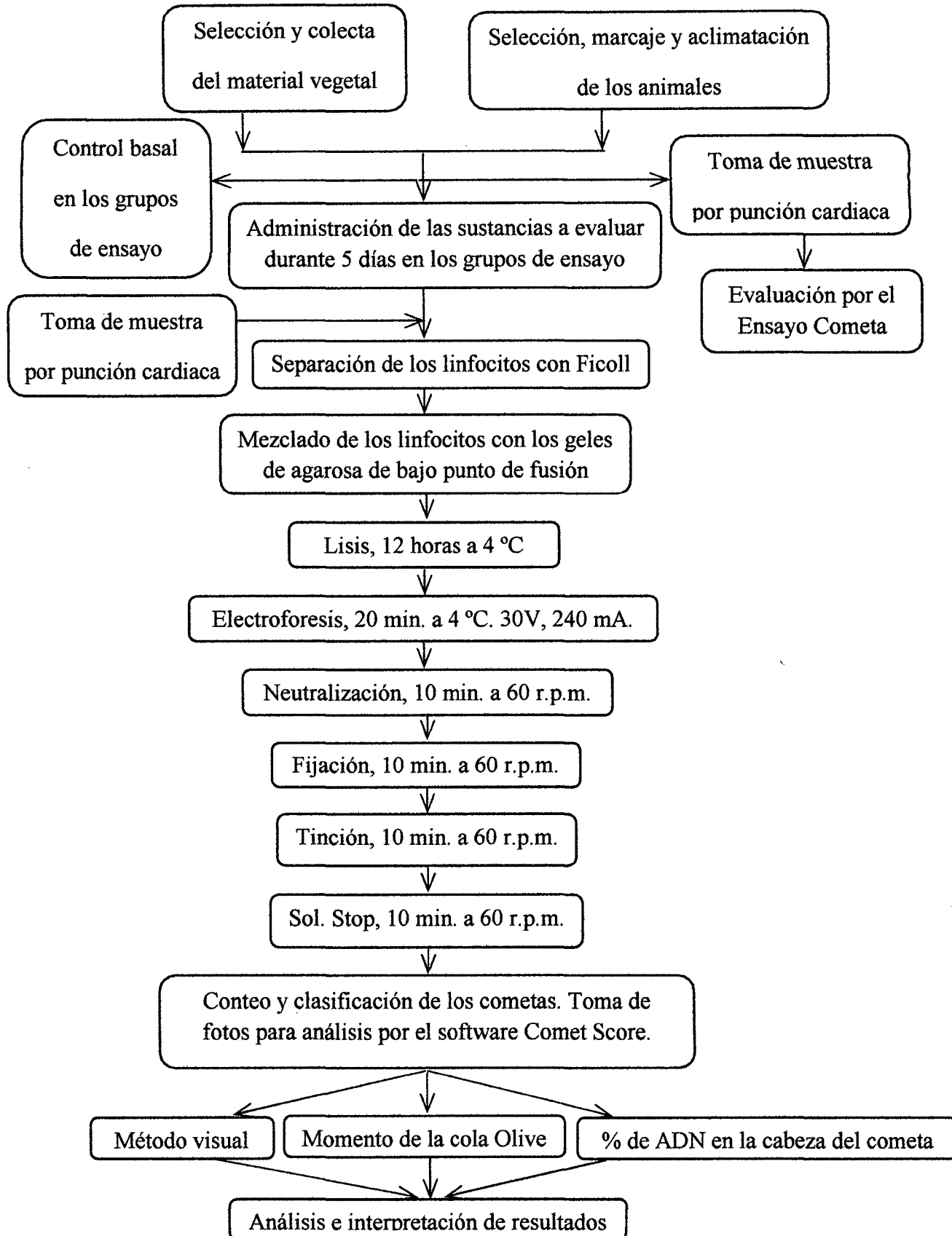
Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Iquitos, 14 de Diciembre del 2009

Blgo. Dr. Manuel Flores A.
Director (e) del AMAZ.



**ANEXO N° 03: Flujograma para la evaluación genotóxica de los extractos por el
Ensayo Cometa**



ANEXO N° 04: Tabla de dosificación

C/F (%)	Factor de Volumen (ml x 10 ⁻²)/p.c															
	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.4	2.6	2.8	3.0	3.2	3.4	3.6	3.8	4.0		
0.05	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	Altamente Tóxico	
0.1	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40		
0.2	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	Moderadamente Tóxico	
0.3	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96	102	108	114	120		
0.4	56	64	72	80	88	96	104	112	120	128	136	144	152	160		
0.5	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200		
1.0	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400		
1.5	210	240	270	300	330	360	390	420	450	480	510	540	570	0		
2.0	280	320	360	400	440	480	520	560	600	640	680	720	760	800		
2.5	350	400	450	500	550	600	650	700	750	800	850	900	950	1000		
3.0	420	480	540	600	660	720	780	840	900	960	1020	1080	1140	1200	Ligeramente Tóxico	
3.5	490	560	630	700	770	840	910	980	1050	1120	1190	1260	1330	1400		
4.0	560	640	720	800	880	960	1040	1120	1200	1280	1360	1440	1520	1600		
5.0	700	800	900	1000	1100	1200	1300	1400	1500	1600	1700	1800	1900	2000		
10	1400	1600	1800	2000	2200	2400	2600	2800	3000	3200	3400	3600	3800	4000		
15	2100	2400	2700	3000	3300	3600	3900	4200	4500	4800	5100	5400	5700	6000		
20	2800	3200	3600	4000	4400	4800	5200	5600	6000	6400	6800	7200	7600	8000	Prácticamente No Tóxico	
25	3500	4000	4500	5000	5500	6000	6500	7000	7500	8000	8500	9000	9500	10000		
30	4200	4800	5400	6000	6600	7200	7800	8400	9000	9600	10200	10800	11400	12000		
35	4900	5600	6300	7000	7700	8400	9100	9800	10500	11200	11900	12600	13300	14000		
40	5600	6400	7200	8000	8800	9600	10400	11200	12000	12800	13600	14400	15200	16000		
45	6300	7200	8100	9000	9900	10800	11700	12600	13500	14400	15300	16200	17100	18000		
55	7700	8800	9900	11000	12100	13200	14300	15400	16500	17600	18700	19800	20900	22000	Inocuo	
65	9100	10400	11700	13000	14300	15600	16900	18200	19500	20800	22100	23400	24700	26000		
75	10500	12000	13500	15000	16500	18000	19500	21000	22500	24000	25500	27000	28500	30000		
85	11900	13600	15300	17000	18700	20400	22100	23800	25500	27200	28900	30600	32300	34000		
95	13300	15200	17100	19000	20900	22800	24700	26600	28500	30400	32300	34200	36100	38000		

ANEXO N° 05: Fórmulas para calcular la cantidad de soluto y solvente para la preparación de los extractos acuosos liofilizados

✓ **Extractos:** *Gentianella alborosea*, *Uncaria guianensis*, *Uncaria tomentosa*.

✓ **Volumen requerido del solvente (solución salina 0.9%):**

$$VS (ml) = PP (g) \times FV \times NI$$

VS : Volumen del solvente

PP : Peso promedio de los animales

FV : Factor de volumen

NI : Número de individuos

✓ **Cantidad requerida del extracto liofilizado:**

$$ExL (g) = \frac{[] g \times VS (ml)}{100 ml}$$

ExL : Extracto liofilizado

VS : Volumen del solvente

[] g : Concentración

✓ **Volumen de la solución preparada del extracto liofilizado para administrar a cada animal:**

$$VI (ml) = P (g) \times FV$$

VI : Volumen administrado

P : Peso del animal

FV : Factor de volumen

ANEXO N° 06: Ficha de recolección de datos: Marcaje y pesado de los animales

Genotoxicidad – Ensayo Cometa.

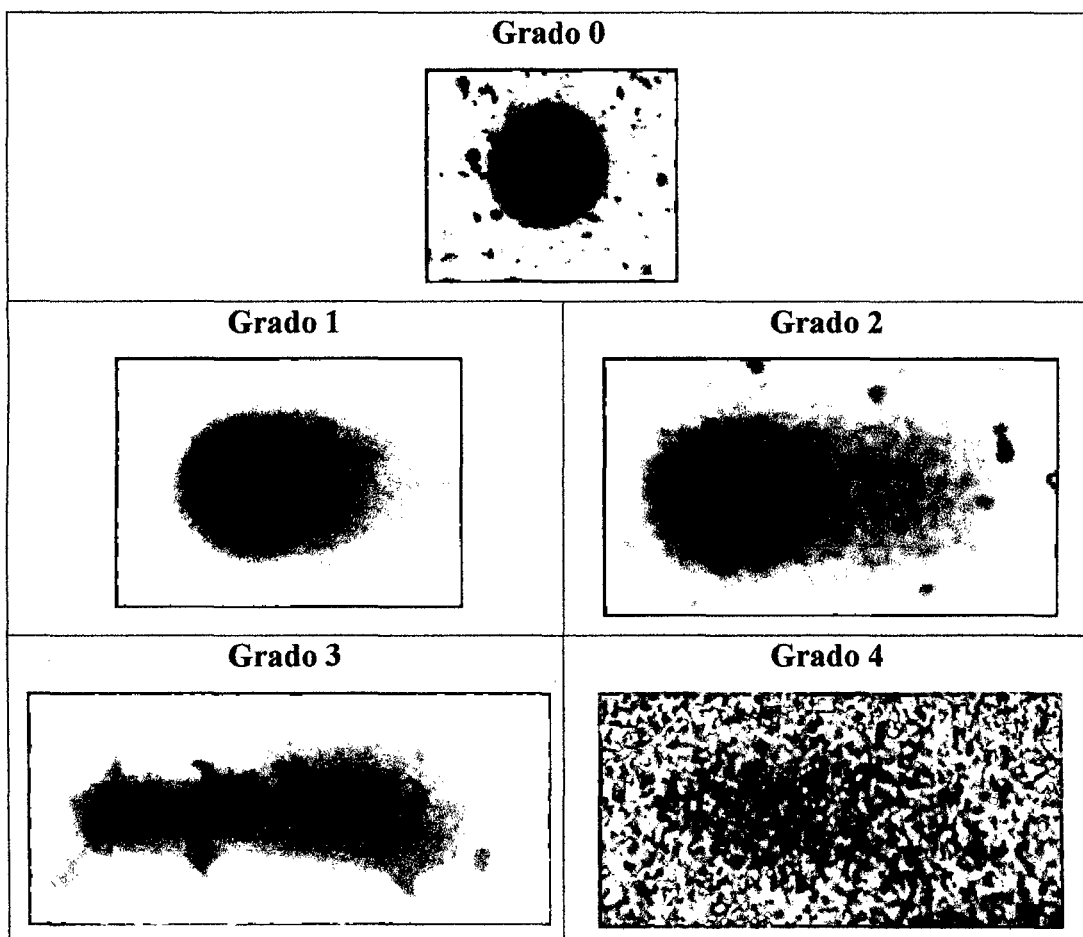
Sustancia:.....

Fecha:..... Sexo:.....

Dosis:.....

MARCA	PESO	OBSERVACIONES

ANEXO N° 07: Criterios de clasificación de los cometas mediante el método visual



ANEXO N° 08: Ficha para la recolección de datos: Evaluación genotóxica – Unidades Arbitrarias

Sexo:	Ensayo cometa – Sustancia:					Total
	N°	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3	
1						
2						
3						
4						

ANEXO N° 09: Peso corporal de ratas albinas machos. (g)

Grupo experimental	0 días X±D	5 días X±D
NaCl 0,9%	173.3±5.97	176.8±5.56
H ₂ O ₂ 1%	164.0±7.62	166.8±6.13
Ciclofosfamida 50 mg/Kg	181.3±3.77	182.0±17.72
<i>Gentianella alborosea</i> 1000 mg/Kg	177.0±27.12	180.8±30.03
<i>Gentianella alborosea</i> 2000 mg/Kg	181.3±11.84	183.8±11.06
<i>Uncaria guianensis</i> 1000 mg/Kg	184.0±19.88	196.8±25.06
<i>Uncaria guianensis</i> 2000 mg/Kg	185.8±12.97	190.0±11.43
<i>Uncaria tomentosa</i> 1000 mg/Kg	165.5±6.81	169.0±7.12
<i>Uncaria tomentosa</i> 2000 mg/Kg	169.3±9.03	173.3±8.54

X±SD: Promedio ± Desviación estándar

ANEXO N° 10: Peso corporal de ratas albinas hembras. (g)

Grupo experimental	0 días X±D	5 días X±D
NaCl 0,9%	161.8±6.13	164.8±6.60
H₂O₂ 1%	165.8±8.85	166.8±8.85
Ciclofosfamida 50 mg/Kg	158.0±8.98	159.8±6.08
<i>Gentianella alborosea</i> 1000 mg/Kg	173.3±11.38	177.3±10.81
<i>Gentianella alborosea</i> 2000 mg/Kg	156.5±8.81	158.0±9.83
<i>Uncaria guianensis</i> 1000 mg/Kg	172.5±11.96	181.0±13.44
<i>Uncaria guianensis</i> 2000 mg/Kg	177.8±10.97	179.3±6.85
<i>Uncaria tomentosa</i> 1000 mg/Kg	160.8±5.91	162.0±8.79
<i>Uncaria tomentosa</i> 2000 mg/Kg	160.8±3.20	163.8±4.79

X±SD: Promedio ± Desviación estándar

ANEXO N°11: Promedios de la lectura por el método visual: Unidades Arbitrarias en ratas albinas machos.

N°	NaCl 0,9 %		H ₂ O ₂ 1%		Ciclof. 50 mg		G. a. 1000 mg		G. a. 2000 mg		U. g. 1000 mg		U. g. 2000 mg		U. t. 1000 mg		U. t. 2000 mg	
	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados
1	6	8	2	315	2	252	3	83	3	52	7	49	7	84	11	54	10	75
2	6	5	3	310	4	261	18	40	7	64	6	39	9	96	14	31	4	91
3	4	5	4	301	10	208	9	20	6	64	11	68	7	104	15	39	0	79
4	1	2	3	300	4	267	1	59	1	51	9	46	11	79	12	35	5	84
X	4	5	3	307	5	247	8	51	4	58	8	51	9	91	13	40	5	82
SD	2.36	2.45	0.82	7.23	3.46	26.72	7.63	26.89	2.75	7.23	2.22	12.40	1.91	11.35	1.83	10.05	4.11	6.90

X: Promedio

SD: Desviación estándar

NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂ 1%: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentianella alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

ANEXO N°12: Promedios de la lectura por el método visual: Unidades Arbitrarias en ratas albinas hembras.

N°	NaCl 0,9 %		H ₂ O ₂ 1%		Ciclof. 50 mg		G. a. 1000 mg		G. a. 2000 mg		U. g. 1000 mg		U. g. 2000 mg		U. t. 1000 mg		U. t. 2000 mg	
	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados
1	11	10	10	317	7	298	6	38	13	70	2	64	1	89	13	36	13	63
2	5	7	4	323	10	308	1	75	4	87	3	90	4	113	11	51	9	57
3	2	4	3	306	3	284	10	63	12	103	6	60	15	82	9	53	0	57
4	3	6	6	328	5	266	8	65	11	67	6	73	12	64	13	49	4	29
X	5	7	6	319	6	289	6	60	10	82	4	72	8	87	12	47	7	52
SD	4.03	2.50	3.10	9.47	2.99	18.22	3.86	15.73	4.08	16.68	2.06	13.33	6.58	20.28	1.91	7.68	5.69	15.26

X: Promedio

SD: Desviación estándar

NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂ 1%: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentianella alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

ANEXO N°13: Promedios del análisis por el software Comet Score v. 1.5: Momento de la Cola Olive en ratas albinas machos.

N°	NaCl 0,9 %		H ₂ O ₂ 1%		Ciclof. 50 mg		G. a. 1000 mg		G. a. 2000 mg		U. g. 1000 mg		U. g. 2000 mg		U. t. 1000 mg		U. t. 2000 mg	
	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados
1	0.09	0.08	0.00	13.22	0.00	10.71	0.01	0.40	0.01	0.12	0.02	0.31	0.04	1.15	0.17	0.60	0.00	0.47
2	0.02	0.08	0.06	13.42	0.02	11.67	0.09	0.32	0.01	0.57	0.02	0.58	0.05	1.45	0.00	0.21	0.00	0.52
3	0.01	0.00	0.01	11.86	0.08	9.84	0.07	0.25	0.00	1.49	0.19	0.30	0.02	1.45	0.03	0.13	0.00	0.07
4	0.03	0.00	0.01	8.88	0.01	8.94	0.01	0.39	0.01	0.53	0.11	0.56	0.03	0.71	0.31	0.05	0.00	0.35
X	0.04	0.04	0.02	11.85	0.03	10.29	0.05	0.34	0.01	0.68	0.09	0.44	0.04	1.19	0.13	0.25	0.00	0.35
SD	0.04	0.05	0.03	2.09	0.04	1.17	0.04	0.07	0.01	0.58	0.08	0.15	0.01	0.35	0.14	0.24	0.00	0.20

X: Promedio

SD: Desviación estándar

NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂ 1%: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentiana alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

ANEXO N°14: Promedios del análisis por el software Comet Score v. 1.5: Momento de la Cola Olive en ratas albinas hembras.

N°	NaCl 0,9 %		H ₂ O ₂ 1%		Ciclof. 50 mg		G. a. 1000 mg		G. a. 2000 mg		U. g. 1000 mg		U. g. 2000 mg		U. t. 1000 mg		U. t. 2000 mg	
	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados
1	0.06	0.02	0.01	9.37	0.02	8.47	0.07	0.61	0.05	0.33	0.00	0.29	0.00	0.76	0.01	0.46	0.00	0.18
2	0.05	0.04	0.14	11.14	0.03	12.24	0.00	0.20	0.01	0.47	0.02	0.33	0.01	0.56	0.02	0.51	0.00	1.09
3	0.10	0.05	0.04	11.93	0.02	4.92	0.12	0.26	0.02	0.39	0.02	0.25	0.12	0.73	0.00	0.34	0.15	0.90
4	0.02	0.03	0.06	11.91	0.03	8.12	0.28	0.16	0.02	0.42	0.02	0.72	0.05	0.75	0.00	0.24	0.02	0.48
X	0.06	0.04	0.06	11.09	0.03	8.44	0.12	0.31	0.03	0.40	0.02	0.40	0.05	0.70	0.01	0.39	0.04	0.66
SD	0.03	0.01	0.06	1.20	0.01	3.00	0.12	0.21	0.02	0.06	0.01	0.22	0.05	0.09	0.01	0.12	0.07	0.41

X: Promedio

SD: Desviación estándar

NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂ 1%: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentiana alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

ANEXO N°15: Promedios del análisis por el software Comet Score v. 1.5: Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas machos.

N°	NaCl 0,9 %		H ₂ O ₂ 1%		Ciclof. 50 mg		G. a. 1000 mg		G. a. 2000 mg		U. g. 1000 mg		U. g. 2000 mg		U. t. 1000 mg		U. t. 2000 mg	
	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados
1	99.5	99.4	100.0	67.9	100.0	72.6	99.8	97.7	99.9	98.8	99.7	97.5	99.4	93.2	98.5	95.0	100.0	94.2
2	99.9	99.4	99.7	66.3	99.7	69.6	99.1	97.6	99.8	96.1	99.7	95.3	99.4	92.1	100.0	97.8	100.0	93.8
3	99.9	100.0	99.9	70.2	99.4	71.7	99.4	98.0	100.0	89.7	98.9	97.9	99.8	91.1	99.7	98.5	100.0	99.2
4	99.8	100.0	99.9	72.4	99.9	70.7	99.9	97.0	99.8	96.8	99.2	96.5	99.7	95.2	98.8	99.6	99.8	95.0
X	99.8	99.7	99.9	69.2	99.7	71.1	99.6	97.6	99.9	95.4	99.4	96.8	99.6	92.9	99.3	97.7	99.9	95.6
SD	0.19	0.32	0.14	2.70	0.26	1.28	0.39	0.46	0.09	3.93	0.41	1.14	0.21	1.75	0.69	1.96	0.09	2.45

X: Promedio

SD: Desviación estándar

NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂ 1%: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentianella alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

ANEXO N°16: Promedios del análisis por el software Comet Score v. 1.5: Porcentaje de ADN en la cabeza de los cometas en ratas albinas machos.

N°	NaCl 0,9 %		H ₂ O ₂ 1%		Ciclof. 50 mg		G. a. 1000 mg		G. a. 2000 mg		U. g. 1000 mg		U. g. 2000 mg		U. t. 1000 mg		U. t. 2000 mg	
	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados	Basal	Tratados
1	99.4	98.8	99.8	72.6	98.8	75.3	99.5	95.7	99.6	96.5	100.0	96.0	100.0	96.0	98.8	96.3	99.9	97.7
2	99.6	99.5	99.2	70.5	98.6	69.7	100.0	98.3	99.9	96.2	99.7	95.5	99.9	96.3	99.7	96.0	99.9	91.9
3	99.5	99.6	99.7	69.1	99.8	84.3	99.3	97.2	99.6	96.3	99.6	96.1	99.0	94.8	100.0	95.7	99.4	95.4
4	99.8	99.6	99.5	67.5	99.7	73.9	98.1	98.4	99.6	97.3	99.6	95.0	99.6	95.4	100.0	97.7	99.8	94.9
X	99.6	99.4	99.5	69.9	99.2	75.8	99.2	97.4	99.7	96.6	99.7	95.6	99.6	95.6	99.6	96.4	99.7	95.0
SD	0.17	0.38	0.24	2.17	0.60	6.14	0.81	1.25	0.14	0.48	0.18	0.50	0.46	0.70	0.57	0.88	0.25	2.40

X: Promedio

SD: Desviación estándar

NaCl: Cloruro de Sodio 0.9%.

H₂O₂ 1%: Peróxido de Hidrógeno 1%.

Ciclof.: Ciclofosfamida 50 mg/Kg.

G.a.: *Gentianella alborosea*

U.g.: *Uncaria guianensis*

U.t.: *Uncaria tomentosa*

FOTO N° 01: Administración de la sustancia por vía oral a ratas albinas cepa

Holtzmann

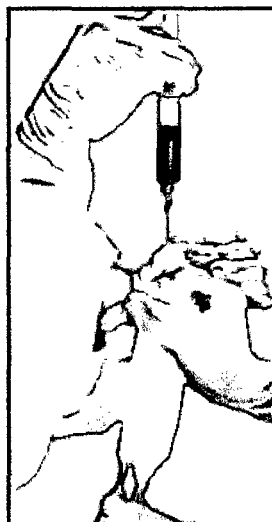


FOTO N° 02: Toma de muestra sanguínea por punción cardiaca



**FOTO N° 03: Muestra de sangre obtenida por punción cardiaca en un microtubo
conteniendo anticoagulante**



FOTO N° 04: Muestra de sangre (capa superior) y Ficoll (capa inferior)

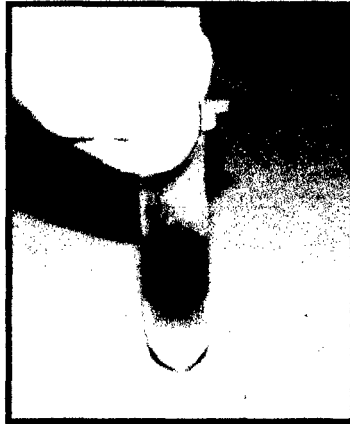


FOTO N° 05: Producto después de la centrifugación, se observa un halo en la capa media



FOTO N° 06: Preparación de las láminas con los geles de agarosa conteniendo los linfocitos para ser sometidos a lisis



FOTO N° 07: Proceso de electroforesis

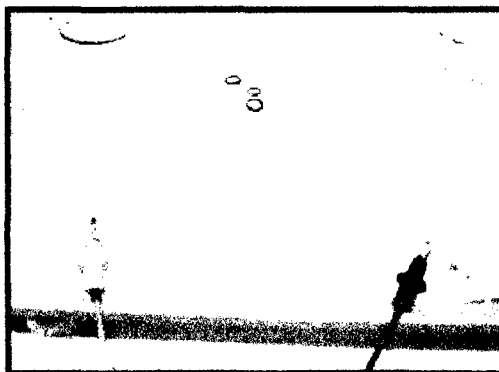


FOTO N° 08: Neutralización de los geles en el agitador horizontal

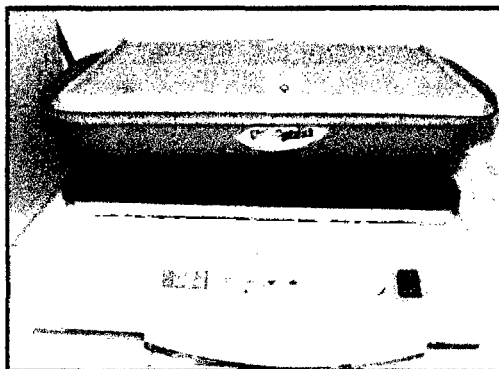


FOTO N° 09: Geles teñidos con las soluciones A y B



FOTO N° 10: Agregado de la solución de detención de tinción sobre los geles teñidos



FOTO N° 11: Producto final, geles en etapa de secado

