

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Efecto del extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa*
“Chuchuwasi” sobre embriones preimplantacionales
de ratón (*Mus musculus*)**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en
Zoología

AUTOR

Gustavo Adolfo Valdivieso Díaz

ASESOR

José Luis Rafael Pino Gaviño

Lima - Perú

2016

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM. Al profesor y asesor José Luis Pino Gaviño, por su paciencia, consejo y guía; a la profesora Betty Shiga Oshige, por sus consejos y aliento; a los tesisistas y demás compañeros del laboratorio con quienes compartimos jornadas de trabajo.

A mis padres Maria Elena, Angel y Oscar, quienes con su amor incondicional, dedicación, esfuerzo y consejos; me sirvieron siempre de guía brindándome su apoyo en todo momento para el logro de mis objetivos personales y profesionales.

A mis hermanos Giovana, Cynthia, Angel y Victor; por la paciencia y los animos. A Shirley Falcón Heran por su constante apoyo y paciencia. A mis compañeros Jacqueline Zarria Romero y María Escalante Rojas por la ayuda prestada en la culminación de este trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	iii
I. INTRODUCCIÓN	
1.1. Situación Problemática	1
1.2. Formulación del Problema	3
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo General	3
1.3.2. Objetivos	3
II. MARCO TEÓRICO	
2.1. Antecedentes	4
2.2. Base Teórica	7
III. MATERIALES Y METODOS	
3.1. Material Biológico	11
3.2. Métodos	12
3.3. Procedimiento de Análisis e Interpretación de la Información	16
3.4. Aspectos Éticos de la Investigación	16
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1. Resultados	17
4.2. Discusión	23
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	
5.1. Conclusiones	26
5.2. Recomendaciones	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXOS	33

RESUMEN

Maytenus macrocarpa (MM) (Ruiz & Pav.) Briq. es un árbol utilizado por poblaciones amazónicas de forma medicinal, para el control de la fertilidad. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto abortivo potencial de diferentes dosis del extracto acuoso de *M. macrocarpa* "chuchuwasi" (25, 50 y 100 mg/kg) sobre embriones preimplantacionales de ratón de la cepa albina Swiss Rockfeller. El extracto fue administrado a los ratones vía intraperitoneal entre el primer y cuarto día de gestación. Se evaluó la calidad y desarrollo de los embriones. Se realizó el test de Micronucleo (MN) a fin de conocer si el extracto de MM era genotóxico. Ninguno de los tratamientos mostro significancia en el número de embriones degradados o inviabiles y en la tasa de MN. Los resultados sugieren que el extracto acuoso de *M. macrocarpa* no tiene un efecto sobre el desarrollo normal de los embriones.

Palabras clave: *Maytenus macrocarpa*, ratón, desarrollo embrionario, genotoxicidad, agentes abortivos

ABSTRACT

Maytenus macrocarpa (MM) (Ruiz & Pav.) Briq. is a tree, used as herbal medicine by Amazonian populations, for fertility control. The objective of this study was to evaluate the potential abortifacient effect of different doses of aqueous extract of *M. macrocarpa* " chuchuwasi " (25, 50 and 100 mg / kg) on preimplantation embryos of albino mice strain Swiss Rockefeller. The aqueous extract was administrated intraperitoneal to mice between the first and fourth day of pregnancy. Embryo quality – development was evaluated. Micronucleous Test was performed to determine if the extract was genotoxic. Any treatment showed a significant increase in number of degraded or non-viable embryos and micronucleous rate. These results suggest that *M. macrocarpa* aqueous extract has no effect on the normal development of embryos.

Key words: *Maytenus macrocarpa*, mouse, embryo development, genotoxicity, abortifacient agents

I. INTRODUCCION

1.1 SITUACION PROBLEMÁTICA

Existe en nuestro medio un creciente interés por la medicina natural, como parte de la medicina tradicional, esto es debido a la realidad que la mayor parte de la población del Perú es rural y que la accesibilidad a la medicina occidental es mínima o nula; ante este escenario se hace necesaria la evaluación de las propiedades de las plantas usadas en la medicina tradicional y sus posibles efectos no deseados (1)

En investigaciones previas se han descrito efectos negativos de algunas plantas de uso medicinal: A) dermatitis alérgica severa y prolongada en *Aloe vera* “sábila”, (2) B) hipertrofia de hepatocitos con *Bixa Orellana* “achiote” (3,4) C) alteraciones en el desarrollo embrionario y muerte fetal en ratón y rata; *Ruta graveolens* “ruda” (1,5) y *Coleus barbatatus* “boldo de la India” (6); y D) sobre el desarrollo de los órganos masculinos en ratones y decrecimiento de la movilidad y densidad espermática; *Ruta graveolens* “ruda” (7).

Siendo el Perú un país megadiverso, posee una abundante variedad de plantas entre ornamentales, comestibles y medicinales; Brack (8) considera que solo en la Amazonía peruana existen unas 3 140 especies útiles, de las cuales 1 044 tienen uso medicinal, en cambio, el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana- IIAAP (9,10) catalogó 322 especies útiles, con el mismo fin.

La información que se tiene de la flora amazónica difícilmente alcanza el 5% de las 60 o 90 mil especies que se estima existen en esta región. Los pueblos amazónicos han utilizado entre 2 000 y 3 000 especies de plantas con propiedades medicinales. En la región noroccidental de la Amazonía, Schultes (1990) ha estudiado 1 513 especies entre medicinales y tóxicas (11)

Entre las plantas amazónicas de amplio uso se encuentra *Maytenus macrocarpa* (Ruiz & Pav.) Briq. (Celastraceae) conocida con diversos nombres como: chuchuhuasi, chuchuhuasu (Colombia, Ecuador); chuchuhuaza, chuchuwasha (Perú); dependiendo de la parte seleccionada, *M. macrocarpa* tiene diferentes usos terapéuticos: La raíz se utiliza en el tratamiento de lumbago, la corteza se usa como antidisentérico, analgésico; como regulador menstrual y estomacal, antiinflamatorio, antitumoral, antihemorroidal, en el tratamiento de leishmaniasis, bronquitis y preventivo de la caries, inmunoestimulante y relajante muscular, además es comercializada como corteza para la fabricación de licores (9,11–14) (9,11–14). Los últimos años la exportación de *M. macrocarpa* mantiene un nivel sostenido, teniendo una buena aceptación de diversos mercados del mundo, siendo Chile su principal destino (Anexos: Cuadro N°1 y 2)

En Perú, uno de los usos tradicionales de *M. macrocarpa* es como anticonceptivo (9) siendo esta propiedad objeto del presente estudio; pues no hay evidencia de si esta propiedad es producto de un efecto nivelador de hormonas o producto de un efecto genotóxico en el embrión. Por lo tanto es pertinente evaluar el posible daño a nivel embriológico que pueda ocasionar la administración de *M. macrocarpa* como anticonceptivo o abortivo.

1.2. FORMULACION DEL PROBLEMA

¿La propiedad anticonceptiva atribuida a *M. macrocarpa* se debe a una alteración en la implantación embrionaria o al efecto genotóxico en los embriones preimplantacionales en el ratón?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

- Evaluar el efecto genotóxico y/o embriotóxico del extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa* "Chuchuwasi" , sobre embriones preimplantacionales de ratón

1.3.2. Específicos

- Determinar la tasa de micronúcleos en células de la medula ósea de ratón expuesta al extracto acuoso de *M. macrocarpa*
- Determinar la tasa de embriones preimplantacionales afectados en su desarrollo y viabilidad, luego de la administración del extracto acuoso de *M. macrocarpa*.

II. MARCO TEORICO

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Existen diversos estudios enfocados en determinar el efecto del uso de plantas medicinales de uso popular sobre el sistema reproductor y la etapa de gestación en ratones; se tienen los siguientes ejemplos:

Almeida(6) realizó una evaluación sobre los efectos tóxicos de *Coleus barbatus* (boldo); centrándose en determinar si la planta interfería con la implantación del embrión o su desarrollo normal; trataron ratas wistar con diferentes dosis (220 y 880 mg/kg) del extracto hidroalcohólico de *C.barbatus*, durante el periodo preimplantacional (0 a 5 días) y periodo organogénico (día 6 al 15). Sus resultados fueron que el tratamiento de 880 mg/kg causaba retraso en el desarrollo fetal y tenía un efecto anti-implantacional; observándose un retraso asociado a toxicidad materna en los fetos del grupo tratados con 880 mg/kg del extracto.

Montanari (15) realizo una investigación con el extracto hidroalcohólico de hojas liofilizadas de *Maytenus Illicifolia* para verificar su potencial abortivo. Se evaluaron la actividad abortiva, la morfología de los órganos reproductivos, actividad estrogénica y actividad embriotóxica. Se usó un solo tratamiento (1000 mg/kg) en ratones de 2 a 4 meses de edad. El tratamiento causó pérdida de embriones en etapa preimplantacional, mas no tuvo un efecto en la implantación u organogénesis. No se encontraron alteraciones morfológicas del sistema reproductor, ni efecto embriotóxico. Se observó un efecto uterotrópico debido a la actividad estrogénica del extracto, sugiriendo que podría intervenir con la receptividad uterina hacia el embrión.

Gupta (16) trabajó con *Albizzia lebbbeck*; administrando por vía oral durante 60 días a ratas machos el extracto metanólico de las vainas en concentraciones de 50, 100 y 200 mg/kg. Realizó pruebas bioquímicas a muestras de sangre e histológicas a los órganos reproductivos. Como resultado observó un decrecimiento significativo en el peso del testículo, vesícula seminal, epidídimo y próstata ventral. La motilidad y densidad espermática fueron significativamente reducidas. Hubo una marcada reducción en el número de espermatoцитos primarios, espermatoцитos secundarios y espermátidas. El conteo de células de Sertoli también sufrió un decrecimiento; las células de Leydig maduras y el área nuclear de las células de Leydig sufrieron un decrecimiento significativo. La proteína, glicógeno y colesterol contenido en el testículo, la fructosa contenida en la vesícula seminal y la proteína en el epidídimo fueron significativamente decrecidas. Se concluyó que el extracto metanólico de la vaina de *A. lebbbeck* causa una detención en la espermatogénesis de ratas albinas macho.

Cunha-Laura (17) realizó una investigación *Maytenus ilicifolia* donde se trataron ratas wistar con extracto hidroacetónico (dosis de 15.11 mg/kg por día) de *M. ilicifolia* en el periodo organogénico (T1) y el periodo gestacional (T2) . No se observó signos clínicos de toxicidad materna. Los fetos no presentaron malformaciones o anomalías, así como el número de implantaciones, reabsorciones, fetos vivos y muertos fueron similares a los del grupo control. Concluyo que el extracto hidroacetónico de *M. ilicifolia* no es toxico en ratas gestantes y aparentemente no interfiere en el progreso del desarrollo embrio-fetal.”

Gonzales (18) hace la evaluación del extracto acuoso liofilizado (EAL) de *Ruta chalapensis* en embriones post implantacionales de ratón, usando dosis de 10 mg/kg en hembras preñadas por vía intraperitoneal. Como resultado se observó que el EAL de ruda no afectó negativamente el peso de la madre pero sí del útero durante el tratamiento ($p < 0,05$). En el grupo tratado la frecuencia de reabsorciones fetales fue mayor ($p < 0,05$) y el peso fetal fue significativamente menor en comparación con el control ($p < 0,01$). Además en el grupo tratado se evidenció la presencia de malformaciones esqueléticas. En conclusión, el EAL de *R. chalapensis* mostró efectos embriotóxicos en ratones expuestos durante el período postimplantacional.

Acosta (19) evaluó el extracto acuoso de *M. macrocarpa* en ratones machos durante 7 días, para determinar su efecto sobre los parámetros reproductivos, el grupo tratado recibió el extracto en una concentración de 1000 mg/kg mediante sonda esofágica. Encontró diferencias significativas en el peso del epidídimo, peso del conducto deferente; así mismo la concentración, movilidad y morfología espermática se vieron afectadas luego del tratamiento. Concluyo que el extracto de *M. macrocarpa* presenta un efecto negativo en el sistema reproductivo masculino de ratones.

2.2. BASE TEORICA

A. *MAYTENUS MACROCARPA* (R. & P.) BRIQ.

A.1. GENERALIDADES

Conocido también como “chuchuwasha” o “chuchuhuasi”, esta planta de la familia celastracea es nativa de la amazonia y muy conocido por los pueblos nativos desde hace miles de años, gracias a sus numerosas virtudes curativas, algunas de la cuales han sido validadas por estudios científicos(8,9,14,20).

Es un árbol mediano de 4 a 18 m de altura, ocasionalmente su dosel crece hasta los 30 m de altura. Tallo cilíndrico ligeramente aplanado por sectores, sin aletas o poco desarrolladas. Su corteza es extremadamente dura, pesada y de color rojizo, internamente presenta un color rojo ladrillo y sabor amargo. Sus hojas son oblongo-lanceoladas o elípticas, presentando alternancia; de 11 a 15 cm de largo por 4-5 cm de ancho, haz lustroso y coráceo. Sus flores son pequeñas y tienen 5 pétalos amarillo verdosos. Frutos anaranjados-rojizos. Semillas marrones con arilo blanco. Crece en suelos arenosos, con buen contenido de materia orgánica, con precipitaciones anuales entre 1000 a 3400 mm(9–11,21,22).

El chuchuhuasi crece en la selva tropical de Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y Perú(23). En el peru se distribuye en los departamentos de Loreto (Tam- shiyacu Panguana 1º y 2º zona e Indiana, río Amazonas, Tahuayo, río Tahuayo, Ushpacaño, río Itaya; Momón y Padre Cocha, río Nanay. Llachapa, río Napo, Carretera Iquitos-Nauta km 15.5 y 45; Corazón de Jesús, río Mazán) Huánuco. Amazonas. Madre de Dios, San Martín, Pasco y Ucayali (Conta- mana) (10).

A.2. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA (APG III 2009)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Fabidae

Orden: Celastrales

Familia: Celastraceae

Género: *Maytenus*

Muchos nombres botánicos han sido dados a esta especie de árbol. Es referido como *Maytenus multiflora*, *M. terapotensis*, *M. macrocarpa*, *Celastrus macrocarpus*, *Haenkea macrocarpa* y *H. multiflora*; todos estos nombres botánicos se refieren al mismo árbol(24).

A.3. Composición Química

En el género *Maytenus* se han descrito diversos compuestos activos como los flavonoides (25) que poseen actividad de protección de la mucosa gástrica en úlceras (26,27) triterpenoquinonas y dímeros triterpenicos con actividad antimicrobiana (28,29), nortriterpeno metilenquinonas con funciones antimicrobianas (30) y maitansinoides que ejercen actividad insecticida (31).

En estudios previos se ha reportado el aislamiento de triterpenos dammarane y triterpenos friedelane a partir de la corteza del tallo (32–34), poliésteres sesquiterpénicos de las hojas (35) y nortriterpenos macrocarpines A-D de sus raíces (36)

B. TEST DE MICRONUCLEOS (MN)

Los micronúcleos se pueden definir como estructuras cromatínicas presentes en el citoplasma, sin ninguna conexión con el núcleo. Se originan a partir de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros que durante el proceso de división celular quedan retrasados en la fase de segregación cromosómica (anafase), es así que no terminan siendo incorporados al núcleo de la célula hija. Estos cromosomas o fragmentos cromosómicos son visibles en el citoplasma bajo la apariencia de un pequeño núcleo, de ahí su denominación “micronúcleo” (37,38).

El ensayo de micro núcleos es uno de los test de genotoxicidad empleados de manera más frecuente, en el cual se evalúa la presencia de pequeñas masas de cromatina en el citoplasma de células nucleadas. En el año de 1999, el ensayo de MN en medula ósea de ratón se validó a nivel mundial, considerándose como buen biomarcador de daño de DNA, creándose un programa internacional sobre ensayo cometa de micro núcleos en células humanas el HUMN: Human Micro Nucleus Project (39) en el cual intervienen más de 30 laboratorios a nivel mundial, para coleccionar datos de las frecuencias de MN en diferentes poblaciones humanas y tipos celulares, unificar protocolos, criterios de conteo, factores que alteran la frecuencia, e intentar establecer la asociación entre la frecuencia de MN y enfermedades tales como el cáncer (38,40–42).

Se consideró el Test de micronúcleos como apoyo en el presente estudio para evaluar si los principios activos del *M. macrocarpa*, tienen algún efecto genotóxico en la madre, y, esto podría explicar su posible efecto embriotóxico.

C. EVALUACIÓN EMBRIONARIA

Una de las pruebas de viabilidad muy usada en fertilización in vitro es el estudio de la gradación y calidad embrionaria, la cual contempla 3 grados con categorías numeradas que van de una calidad alta a la más baja (grado I- III) y una categoría para la degeneración (43,44); el sistema de gradación de embriones indica si los embriones tiene el potencial para continuar su desarrollo. Este sistema toma en cuenta el correcto clivaje de los blastómeros (los cuales deben ser de igual tamaño y no extraídos de la masa embrionaria compacta), además de la ausencia y presencia de fragmentaciones citoplasmáticas(18).

Los diferentes estados y gradaciones se realizaron siguiendo la metodología propuesta por Baczkowski (44).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se trabajó con 32 ratones *Mus musculus* de la cepa albina *Swiss Rockfeller*, obtenidos del bioterio de la Universidad Cayetano Heredia y mantenidos en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, de 6 a 8 semanas de edad. Los cuales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio: temperatura (22°C), humedad y fotoperiodo (14 horas de luz y 10 horas de oscuridad) con alimento balanceado para animales (Alitech) y agua *ad libitum*.

3.1.2 PLANTA A EVALUAR

La corteza en polvo de *Maytenus macrocarpa* (R.&P.)Briq. fue adquirida a la empresa PROMO AGRO EXPORT S.A.C. Previamente se solicitó la certificación de la especie; la empresa hizo entrega de la constancia emitida por la Bióloga acreditada Graciela Vilcapoma Segovia de Andia N° CBP 811, quien hace la identificación taxonómica de las cortezas enteras antes del proceso de molienda. (Fig. 1 – Anexos)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO

La corteza en polvo de *M. macrocarpa* se hirvió en agua destilada por 30 minutos en una concentración de 10g por litro. Luego la infusión se dejó enfriar toda la noche. Al día siguiente el sobrenadante fue filtrado dos veces usando papel filtro estéril Whatman (40 μ y 20 μ respectivamente). Finalmente se hicieron las diluciones hasta llegar a las concentraciones deseadas de cada grupo T1: 25mg/kg, T2: 50mg/kg y T3: 100mg/kg. Luego se guardaron en frascos ámbar a una temperatura de -20°C hasta su uso.

3.2.2 TRATAMIENTO

Se formaron cuatro grupos de 8 individuos (N=8), los cuales contenían a los 3 grupos de tratamiento y el grupo control. Todas las hembras (vírgenes) con una edad de entre 6 a 8 semanas, las cuales fueron cruzadas con machos fértiles de 8 a 12 semanas, comprobándose la cópula por la presencia de tapón vaginal en las primeras horas de la mañana siguiente.

Las hembras fecundadas (día uno) formaron tres (3) grupos de tratamiento TI, TII y TIII (cada uno con N= 8) a los cuales se les suministro intra peritonealmente (ip) por un lapso de 4 días; 100, 50 y 25 mg/kg de peso corporal respectivamente el extracto acuoso de chuchuwasi, un cuarto grupo C (grupo control con N=8) se le inyectó solo agua destilada; al concluir el plazo, fueron sacrificadas mediante dislocación cervical¹.

¹ La dislocación cervical es un método aceptado para roedores pequeños de menos de 150 gr. según recomendación del DGXI de la Comisión Europea, para ser utilizado con la Directiva 86/609/EEC del 24 de Noviembre de 1986, relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (Nº L358, ISSN 0378-6978) .

3.2.3 TEST DE MICRONÚCLEOS

La preparación de las láminas se realizó siguiendo las pautas de Schmid (45), modificadas en el Laboratorio de Reproducción y Biología del desarrollo de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las células de medula ósea del fémur se aislaron en buffer fosfato salino suplementado con BSA al 5%, qué posteriormente se centrifugo a 1500rpm. Se descartó el sobrenadante y luego fueron suspendidas en buffer fosfato salino. Para luego realizar el frotis en las láminas y posteriormente fijadas en metanol absoluto por 10 min.

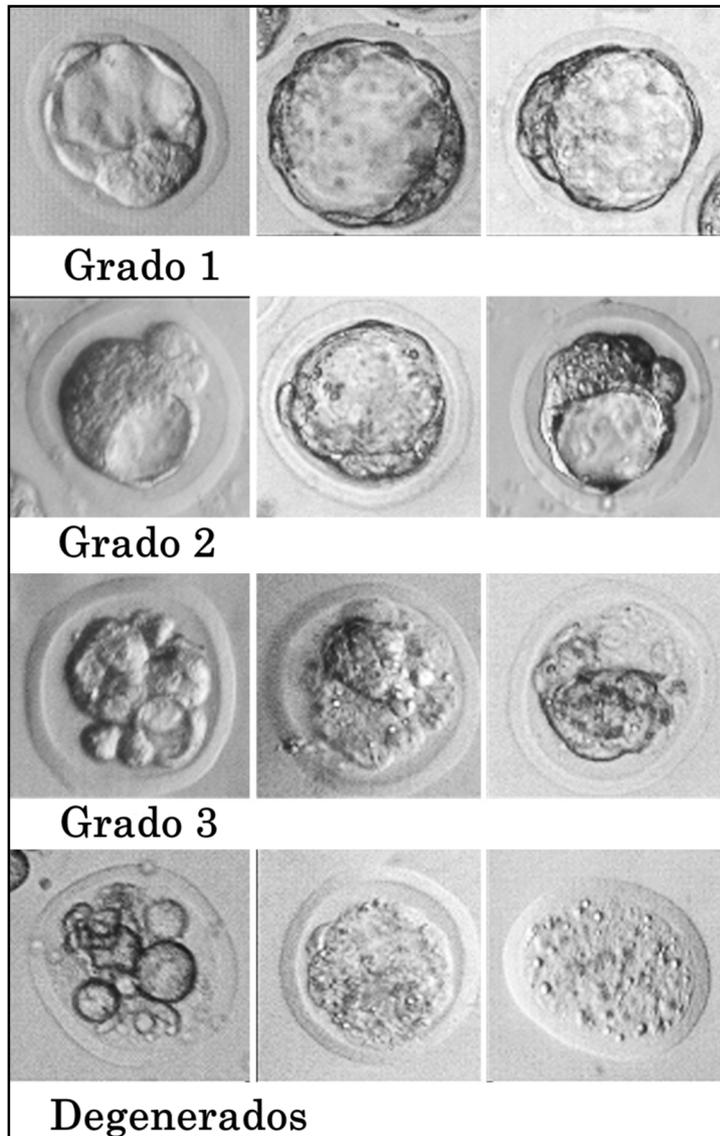
Se tiñeron las láminas en Giemsa al 2% por 15 min. Y se dejó secar al ambiente. El análisis se realizó con ayuda de un microscopio óptico a un aumento de 1000X. Se contabilizaron 2000 células por ratón, las cuales fueron analizadas para determinar el número de eritrocitos policromáticos (EPC) y normocromáticos(ENC), al igual que la presencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos (MCNEPC), registrándose la relación ENC/EPC, indicadora de citotoxicidad medular (ANEXOS-Fotografía N°2B); los micronúcleos son redondos y su diámetro es aproximadamente 1/20 a 1/5 de un eritrocito.

3.2.5 EVALUACIÓN EMBRIONARIA

A las hembras sacrificadas se les extirparon los oviductos y los cuernos uterinos; luego los embriones fueron obtenidos por perfusión, mediante lavados sucesivos con Buffer Fosfato Salino (PBS; SIGMA) pH 7,4 (Véase cuadro N°4-anexos). Los embriones se examinaron en un microscopio de contraste de fase y se determinó el grado de viabilidad realizando una evaluación morfológica considerando lo siguiente (43): Grado 1: el embrión es redondo y no tiene blastómeros libres; Grado 2: El embrión tiene blastómeros libres; Grado 3: el embrión tiene blastómeros libres y

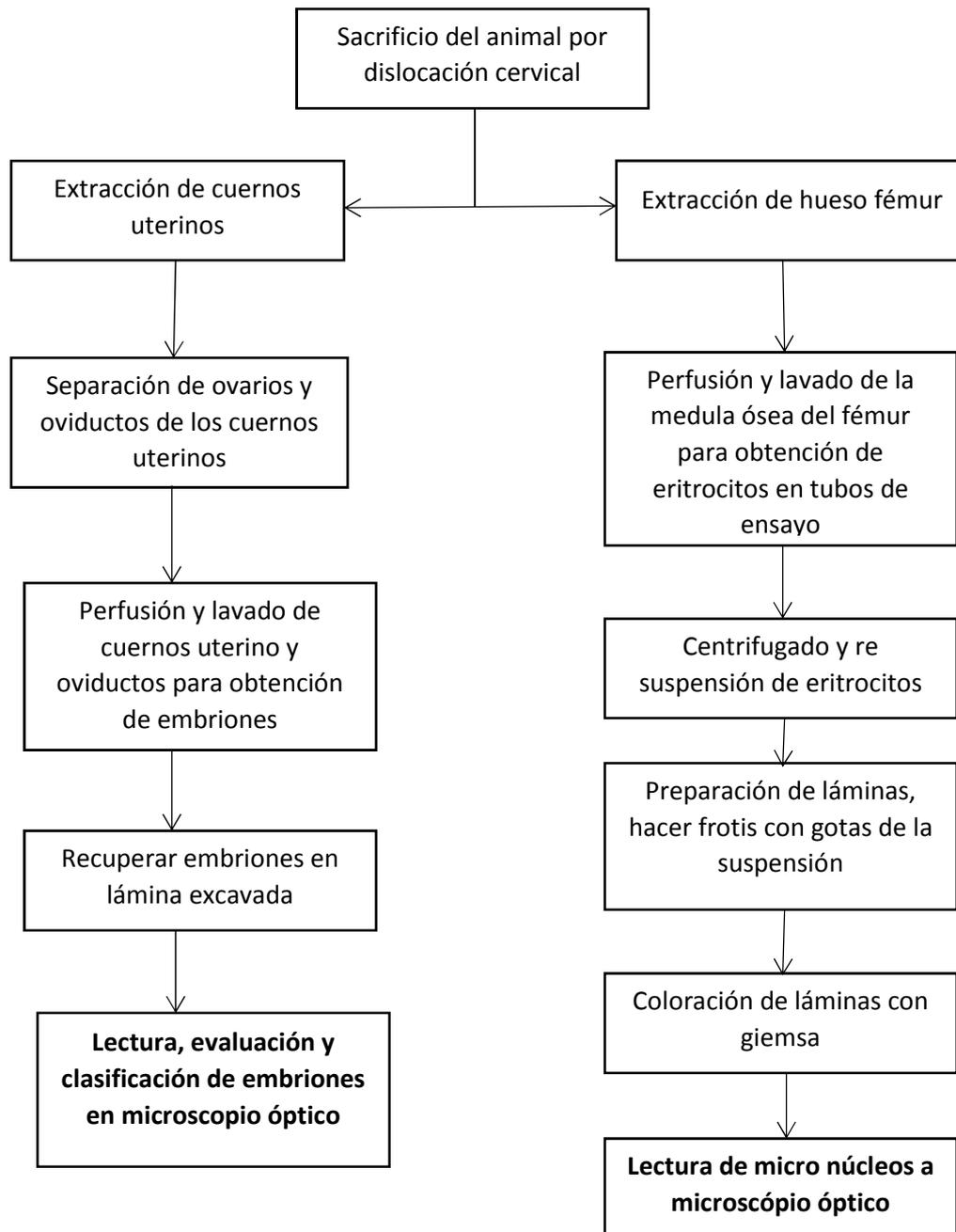
malformaciones severas; Degenerados: el embrión pierde su forma esférica, además presenta membrana(s) celular(es) rotas. (Fig. N°1)

Figura N°1: Gradación de embriones preimplantacionales de 96 hpc



Gradación de embriones de Dorn y Kramer (43), modificada por Benavides (46) en el Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

Cuadro N°1: Flujoograma de Procedimientos



3.3 PROCEDIMIENTO DE ANALISIS E INTERPRETACION DE LA INFORMACIÓN

Luego de la recolección de datos, estos fueron procesados mediante el programa SPSS v21 para Windows. Los datos cumplieron las premisas de normalidad y homogeneidad (Prueba de Levene). Se realizó el test de Ji cuadrado y/o el test exacto de Fisher para la evaluación embrionaria y el Análisis de Varianza (ANOVA) para el Test de Micro núcleos. Se consideró estadísticamente significativo un valor $p < 0.05$.

3.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para la realización del estudio se presentó el proyecto al Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; el que dio su conformidad el 22 de mayo de 2014. (Fig. 2 – Anexos)²

² Todos los procedimientos con animales de experimentación se basaron en las normas *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del National Research Council* de los Estados Unidos de Norteamérica (47).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Luego de haberse obtenido los datos de las evaluaciones, estos fueron procesados y presentados en gráficos y/o tablas para su análisis e interpretación, considerando el marco teórico, así tenemos que:

4.1 RESULTADOS

A. TEST DE MICRONUCLEOS

En la tabla N°1 se muestran los resultados obtenidos para la frecuencia de micronúcleos. Se obtuvieron las siguientes medias en el conteo de micronúcleos para los tratamientos: T1= 6.00 ± 0.423 , T2= 7.13 ± 0.479 , T3= 6.25 ± 0.559 y para el grupo control C= 4.75 ± 0.366 .

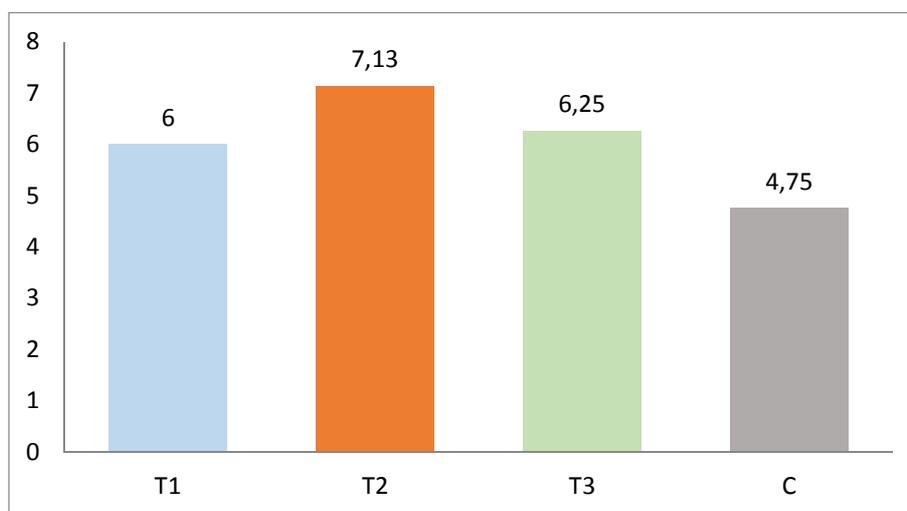
TablaN°1: Frecuencias de MN.

Grupo	Dosis	MN	EPCMN/2000EPC Media \pm EE
C	agua destilada	5/4/5/5/3/3/5/4	4.75 ± 0.366
T1	chuchuhuasi 25mg/kg	6/5/5/5/5/7/7/8	6.00 ± 0.423
T2	chuchuhuasi 50mg/kg	9/6/6/9/6/8/6/7	7.13 ± 0.479
T3	chuchuhuasi 100mg/kg	8/9/4/6/6/5/6/6	6.25 ± 0.559

T1= 25mg/kg; T2= 50mg/kg; T3= 100mg/kg; C= agua destilada; Número de individuos evaluados = 8

En el grafico N°1 se muestra las medias de MN de cada tratamiento en los ratones hembra tratados. Se observa que todos los tratamientos muestran medias superiores al grupo control C, siendo el tratamiento T2 (50mg/kg) el que presenta una mayor media con respecto al grupo control C (agua destilada); en cuanto los tratamiento T1 (25mg/kg) y T3 (100mg/kg) muestran tener medias parecidas y mayores que el grupo control C.

Grafico N°1: Comparación entre la frecuencia de micronúcleos (MN)



La tabla N°2 muestra los resultados del índice de citotoxicidad, todos los valores mostrados no muestran significancia entre los tratamientos y el grupo control

Tabla 2: Media de los Índices de Citotoxicidad

	T1	T2	T3	C
N	8	8	8	8
Media	3,1783	2,9283	3,3083	3,9883
Error típico de la media	,07722	,06096	,24668	,22222
Desviación típica	,18915	,14932	,60423	,54433

En la Tabla N°3 se muestran los resultados obtenidos de la prueba de análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significancia (Sig.) $p < 0.05$. Se observa que los sig. de todos los tratamientos (T1; T2; T3) enfrentados con el grupo control (C) son mayores al 0.05, por lo que se concluye que las medias de las frecuencias de micronúcleos encontrados en cada tratamiento no varían de forma significativa con respecto al grupo control.

Tabla de ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos (Combinadas)	,750	2	,375	,203	,823
T1 x C Intra-grupos	9,250	5	1,850		
Total	10,000	7			
Inter-grupos (Combinadas)	1,375	2	,688	,299	,754
T2 x C Intra-grupos	11,500	5	2,300		
Total	12,875	7			
Inter-grupos (Combinadas)	4,500	2	2,250	,865	,476
T3 x C Intra-grupos	13,000	5	2,600		
Total	17,500	7			

T1xC = comparación tratamiento 1 vs control, T1xC= tratamiento 2 vs control, T3xC=tratamiento 3 vs control, gl= grados de libertad, F= F de Fisher- Snedecor, Sig.= nivel de significancia

B. EVALUACION EMBRIONARIA

B.1 Evaluación morfológica de embriones

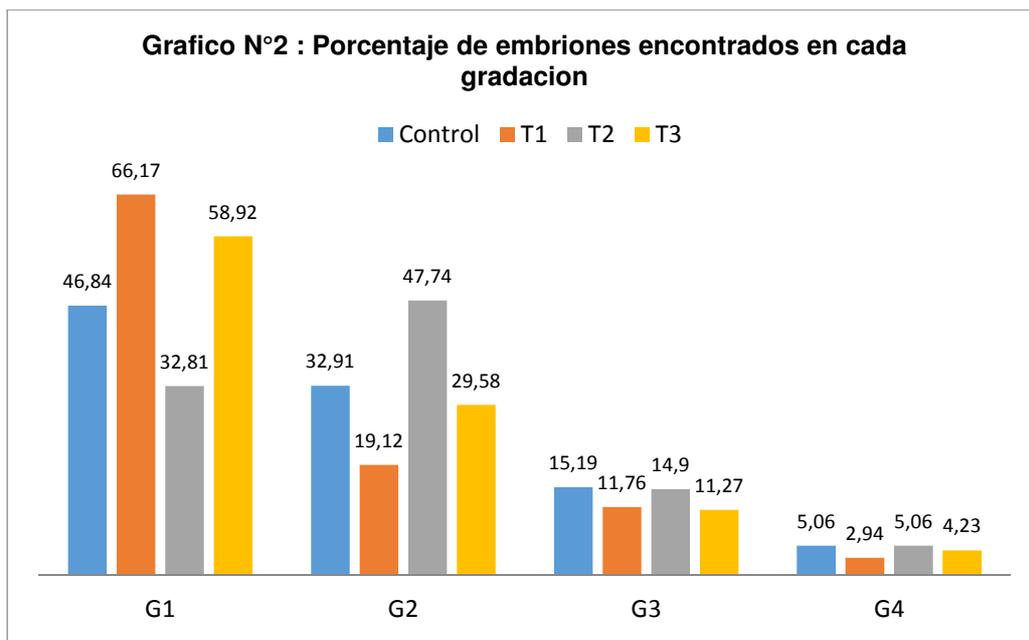
Los embriones obtenidos de cada individuo (N=8 para cada grupo evaluado), fueron clasificados y evaluados según la gradación de Dorn y Kramer (43) modificado en el Laboratorio de Reproduccion y Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM por Benavides(46) , expresados en porcentaje en la tabla N°3. En el grupo tratados con 25 mg/kg (T1) obtuvimos un total de 68 embriones, para el tratamiento de 50mg/kg (T2) un total de 67 embriones, para el tratamiento de 100mg/kg (T3) un total de 71 embriones y para el grupo control (C) se obtuvieron 79 embriones .

Tabla N°4: Porcentaje de embriones encontrados en cada gradación

	G1	G2	G3	G4	Total embriones
Control	46.84(37)	32.91(26)	15.19(12)	5.06(4)	79
T1	66.17(45)	19.12(13)	11.76(8)	2.94(2)	68
T2	32.81(22)	47.74(32)	14.9(10)	5.06(3)	67
T3	58.92(39)	29.58(21)	11.27(8)	4.23(3)	71

Dónde: T1= 25mg/kg, T2= 50mg/kg, T3= 100mg/kg, G1= grado1, G2= grado2, G3= grado3, G4= grado4. Los números en paréntesis indican el número de embriones evaluados.

En el grafico N°2 se muestran los resultados de la evaluación morfológica de embriones, se observa un aumento en el número de embriones de grado G1 (66.17%) del tratamiento T1 (25mg/kg) y disminuyendo los de grado G2 (19.12%), con respecto al grupo control C (G1: 46.84% y G2: 32.91%); que terminan siendo significativos según el Test de Ji cuadrado (Tabla N°5). Para el tratamiento T2 (50mg/kg) ocurre lo inverso siendo el único de los tratamientos que aumenta la gradación G2 de manera significativa (casi 15%). (Fotografía N°2-anexos).



Dónde: T1= 25mg/kg, T2= 50mg/kg, T3= 100mg/kg, G1= grado1, G2= grado2, G3= grado3, G4= grado4. Los números en paréntesis indican el número de embriones evaluados

Los datos fueron analizados utilizando el Test de Ji cuadrado, de acuerdo esto se encontraron diferencias significativas en las medias de G1 y G2 para los tratamientos T1 y T2 con respecto al grupo control. No se encuentran diferencias significativas en los grados de degradación G3 y G4 para ninguno de los tratamientos. Se considera significativo cuando $P > 0.05$ (Sig 0.05= 3.84).

Tabla N°5: Prueba de Ji cuadrado

	G1	G2	G3	G4	sig 0.05
CxT1	7.98	5.78	1.06	0.89	3.84
CxT2	4.2	6.68	0.01	0	3.84
CxT3	3.11	0.34	1.01	0.14	3.84

Dónde: CxT1= control vs tratamiento 1, CxT2= control vs tratamiento2, CxT3= control vs tratamiento 3; G1= grado 1, G2=grado 2, G3= grado 3, G4= grado 4 o degenerados; sig.= nivel de significancia

Los grados G3 y G4 no presentan variaciones significativas en ninguno de los tratamientos utilizados en esta investigación.

B.2. Número de embriones por estadio

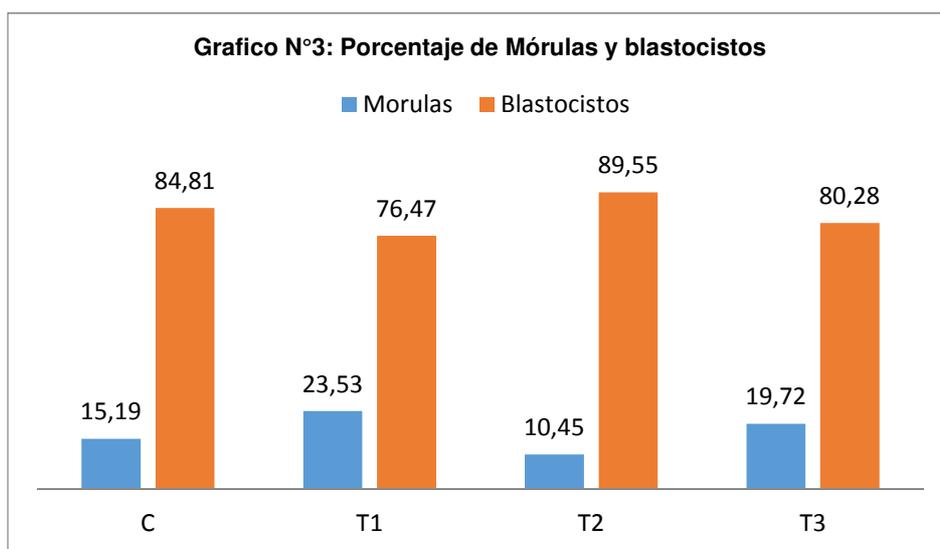
Se realizó el conteo de mórulas y blastocistos para verificar si el extracto acuoso de *M. macrocarpa*, tiene un efecto sobre el desarrollo normal del embrión. En la tabla N° 6 se muestran los porcentajes de mórulas y blastocistos encontrados; se observa un incremento en el número de mórulas en el Tratamiento T1 (25mg/kg), pero la disminución en el número de blastocistos no llega a ser significativa.

Tabla N°6 Porcentaje de mórulas y blastocistos

	Mórulas	Blastocistos	Totales
C	15.19% (12)	84.81%(67)	79
T1	23.53%(16)	76.47%(52)	68
T2	10.45%(7)	89.55%(60)	67
T3	19.72%(14)	80.28%(57)	71

Dónde: C=control, T1=tratamiento1, T2=tratamiento2, T3=tratamiento3. Los números en paréntesis indican el número de embriones evaluados.

En el grafico N°3 se muestra los porcentajes de mórulas y blastocistos por cada tratamiento en comparación con el grupo control. Se observa una diferencia en el porcentaje de mórulas entre el tratamiento T1 y el grupo control C.



En la tabla N°7 se muestra los resultados del Test de Ji cuadrado, en el que se comprueba que todos los tratamientos no muestran diferencias significativas con el grupo control, excepto el tratamiento T1 para el número de mórulas. Se consideran significativas cuando $P > 0.05$ (Sig 0.05= 3.84).

Tabla N°7: Resultados de Test de Ji cuadrado para mórulas y blastocistos

	Mórulas	Blastocistos	sig 0.05
CxT1	4.58	0.82	3.84
CxT2	1.48	0.26	3.84
CxT3	1.35	0.24	3.84

Dónde: CxT1= control vs tratamiento 1, CxT2= control vs tratamiento 2, CxT3= control vs tratamiento 3; G1= grado 1, G2=grado 2, G3= grado 3, G4= grado 4 o degenerados; sig.= nivel de significancia

4.2 DISCUSIÓN

4.2.1 Test de micronúcleos

Este estudio demostró que el número de micronucleos aumenta ligeramente esta diferencia no llega a ser significativa entre las dosis utilizadas (25,50 y 100mg/kg p.c.) del extracto acuoso de *M. macrocarpa* y el grupo control (agua destilada). Estudios realizados con la ciclofosfamida (CF) demuestran una íntima relación entre el daño cromosómico causado en el hígado fetal (utilizando el ensayo de micronúcleos transplacentarios) y el efecto teratogénico causado por esta sustancia (48). *Porter y Singh* (49) plantean la hipótesis de que el efecto clastogénico podría tener una expresión en el daño estructural cuando se administra la sustancia durante la preñez. Estos estudios nos ayudan a relacionar un posible efecto embriotóxico a partir de un efecto genotóxico en la madre durante la gestación. Los resultados obtenidos en el presente estudio corroboran esta premisa, puesto que no hay una

diferencia significativa en la frecuencia de micronúcleos entre los grupos tratados versus el grupo control; por lo que al no haber genotoxicidad en la madre esta no se manifiesta afectando a los embriones en su normal desarrollo y viabilidad, según los resultados obtenidos donde se observa que no hay una diferencia significativa entre los embriones degenerados y normales, de los grupos tratados comparados con el grupo control.

Varias observaciones apoyan la existencia de una asociación entre la inducción de MN y el desarrollo de cáncer (37,41). Algunas investigaciones en el género *Maytenus* reportan propiedades antimutagénicas frente a compuestos genotóxicos, así como una acción antitumoral atribuida a su contenido de triterpenoides (50,51). Varios receptores celulares están involucrados en la actividad anticancerígena de los triterpenoides, incluyendo un receptor aril hidrocarbon, el receptor andrógeno y proteínas de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)(52). Asimismo se han reportado propiedades antitumorales de la pristimerina celastrol metilester, un triterpeno aislado de *Celastrus* y *Maytenus spp.*; que puede inhibir el complejo NF- κ B, presente en células tumorales, además de inducir la apoptosis en células mielómicas(53). Estas propiedades antimutagénicas y anticancerígenas atribuidas a los triterpenoides del género *Maytenus*, pueden explicar que el extracto acuoso de *M. macrocarpa* no induzca la aparición de un mayor número de micronúcleos en las células de la médula ósea de ratón utilizados en el presente estudio.

4.2.2 Evaluación embrionaria

Montanari (15) no encuentra una actividad embriotoxica de *M. ilicifolia*, obteniendo un 94% de los embriones con morfología normal; así como una actividad estrogénica que podría causar la pérdida de embriones preimplantacionales. Nuestros resultados con las diferentes dosis de *M. macrocarpa* nos da como resultado: T1= 85.29%, T2= 80.55%, T3= 88.5%; C= 79.75% de embriones normales (se considera la suma de porcentajes de embriones de grado 1 y grado 2); no evidenciándose un efecto embriotoxico. Esto sugiere que ambas especies del género *Maytenus* comparten la propiedad de no ser embriotóxicas para los embriones de ratón; corroborando el estudio de Cunha-Laura (17), quien no encuentra evidencia de toxicidad, ni interferencia en el desarrollo embrio-fetal en ratas tratadas con *M. ilicifolia*.

Se ha demostrado también que hay plantas estrogénicas con la capacidad de interrumpir la gestación temprana en ratas y ratones, a través de la inhibición de la oleada de estrógeno necesario para la implantación (54). En ratones y humanos los estrógenos juegan un rol importante porque participan en el balance estrógeno/progesterona y de este modo en la receptividad uterina (55,56).

Los resultados nos muestran que el extracto acuoso de *M. macrocarpa*, no presenta un efecto en el desarrollo normal de los embriones preimplantacionales, pues los porcentajes son los esperados de acuerdo al grupo control; existe una diferencia significativa en el número de morulas para el tratamiento T1, sin embargo en el mismo tratamiento la disminución del porcentaje de blastocistos no resulta ser significativa. El que el desarrollo de los embriones no se vean afectados por el género *Maytenus* también lo evidencia Cunha-Laura (17) para *M. ilicifolia*; Montanari

(15) al trabajar con la misma planta en el 2002 encuentra que hay pérdida de embriones en etapa de preimplantación, aunque no así evidencia un efecto en la implantación, agrega que se observa un efecto uterotrópico que puede ser el causante de ese resultado.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

Por los resultados presentados en este trabajo, se concluye:

- Mediante la evaluación morfológica de embriones, se determina que el extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa* no produce un incremento en el número de embriones degradados y/o inviables, en los 3 tratamientos utilizados en el presente estudio.
- Mediante la evaluación del porcentaje de embriones por estadio, se determina, que las concentraciones (T1= 25mg/kg, T2= 50mg/kg y T3= 100mg/kg) utilizadas en el presente estudio del extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa*, no parecen afectar el desarrollo normal de los embriones en etapa preimplantacional.

5.2 RECOMENDACIONES

- Es necesario realizar un estudio en etapa post implantacional, que permita comprobar la acción uterotrópica de *M. macrocarpa*, esto en base la presencia de diterpenoides en su composición química, que han sido reportados como causantes de un efecto relajante en la motilidad de los oviductos en ratas (6)
- Se recomienda realizar un estudio del extracto de la corteza de *M. macrocarpa* (sinónimo de *M. krukovii*) frente a diferentes agentes mutagénicos para determinar el grado de protección que puede ofrecer el extracto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benavides, V., Trujillo, G, D'Arrigo, G., Pino, J. Evaluación Toxicologica preliminar de *Ruta graveolens*, *Origanum vulgare* y *Persea americana* sobre embriones preimplantacionales de ratón. *Rev Peru Biol* [Internet]. 2000;7(1). Recuperado a partir de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologia/v07_n1/evaluacion_toxicologica.htm
2. Ernst E. Adverse effects of herbal drugs in dermatology. *Br J Dermatol*. noviembre de 2000;143(5):923-9.
3. Hagiwara A, Imai N, Ichihara T, Sano M, Tamano S, Aoki H, et al. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. agosto de 2003;41(8):1157-64.
4. Paula H de, Pedrosa ML, Júnior R, Victor J, Haraguchi FK, Santos RC dos, et al. Effect of an aqueous extract of annatto (*Bixa orellana*) seeds on lipid profile and biochemical markers of renal and hepatic function in hipercholesterolemia rats. *Braz Arch Biol Technol*. diciembre de 2009;52(6):1373-8.
5. de Freitas TG, Augusto PM, Montanari T. Effect of *Ruta graveolens* L. on pregnant mice. *Contraception*. enero de 2005;71(1):74-7.
6. Almeida FC, Lemonica IP. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. *J Ethnopharmacol*. noviembre de 2000;73(1-2):53-60.
7. Khouri NA, El-Akawi Z. Antiandrogenic activity of *Ruta graveolens* L in male Albino rats with emphasis on sexual and aggressive behavior. *Neuro Endocrinol Lett*. diciembre de 2005;26(6):823-9.
8. Brack Egg, Antonio. Especies frutales nativas y vegetación melífera en la selva central. San Ramón (Perú): Proyecto Peruano/Alemano. Desarrollo forestal y agroforestal en la selva central. 1987. 50 p.
9. Mejía, K. R. E. Plantas medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana. Iquitos: AECI/GRL/IIAP; 1995. 249 p.
10. Rengifo, E. Las Ramas Floridas del Bosque. Experiencias en el Manejo de Plantas Medicinales Amazónicas. Iquitos: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana; 2007. 40-41 p.
11. Rengifo, Elsa. Plantas Medicinales de la Amazonía Peruana. Estudio de su uso y cultivo. Inst Investig Amazon Peru. 1997;

12. Brack Egg A. Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. [Peru?]; Cuzco: Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo; Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de Las Casas; 1999.
13. Kvist, L. P., Oré, Isabel G Anrea, Llapapasca, Consuelo. Estudio De Plantas Medicinales en la Amazonía Peruana: Una evaluación de ocho métodos etnobotánicos. *Folia Amaz.* 2001;12(1-2):53-73.
14. Gonzales, J, Delle F, Delle G. Chuchuhuasha - a drug used in folk medicine in the Amazonian and Andean areas. A chemical study of *Msytenuis laevis*. *J Ethnopharmacol.* 1982;5:73-7.
15. Montanari T, Bevilacqua E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. *Contraception.* febrero de 2002;65(2):171-5.
16. Gupta RS, Kachhawa JBS, Chaudhary R. Antifertility effects of methanolic pod extract of *Albizzia lebbeck* (L.) Benth in male rats. *Asian J Androl.* junio de 2004;6(2):155-9.
17. Cunha-Laura AL, Auharek SA, Oliveira RJ, Siqueira JM, Vieira MC, Leite VS, et al. Effects of *Maytenus ilicifolia* on reproduction and embryo-fetal development in Wistar rats. *Genet Mol Res GMR.* 2014;13(2):3711-20.
18. Gonzales, J., Benavides, V., Pino, J. Efecto embriotóxico y teratogénico de *Ruta chalepensis* L. «ruda», en ratón (*Mus musculus*). *Rev Peru Biol.* julio de 2007;13(3):223-5.
19. Acosta LG, Vásquez J, Núñez V, Pino J, Shiga B. Efecto de *Maytenus macrocarpa* «Chuchuhuasi» en el sistema reproductor masculino del ratón (*Mus musculus*). *Rev Peru Biol.* 14 de marzo de 2014;20(3):223-6.
20. Bruni R, Rossi D, Muzzoli M, Romagnoli C, Paganetto G, Besco E, et al. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. *Fitoterapia.* diciembre de 2006;77(7-8):538-45.
21. Mostacero León J, Mejía Coico F, Gamarra Torres O, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Peru). *Fanerógamas del Perú: taxonomía, utilidad y ecogeografía.* Trujillo, Perú: CONCYTEC; 2009.
22. Kroll B, Marmillod D. *Apuntes dendrológicos del Perú: nombres vernaculares y especies de Dantas.* Universidad Nacional Agraria La Molina, Unidad Modelo de Manejo y Producción Forestal Dantas; 1992. 256 p.
23. Duke JA. *Duke's Handbook of Medicinal Plants of Latin America.* CRC Press; 2008. 962 p.
24. Taylor, L. *The Healing Power of Rainforest Herbs: A Guide to Understanding and Using Herbal Medicinals.* Square One Publishers, INC.; 2005. 535 p.
25. Tiberti LA, Yariwake JH, Ndjoko K, Hostettmann K. Identification of flavonols in leaves of *Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium* (Celastraceae) by LC/UV/MS analysis. *J Chromatogr B.* 1 de febrero de 2007;846(1-2):378-84.

26. Leite JPV, Rastrelli L, Romussi G, Oliveira AB, Vilegas JHY, Vilegas W, et al. Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Flavonoid Glycosides from Brazilian Beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *J Agric Food Chem.* 1 de agosto de 2001;49(8):3796-801.
27. de Souza LM, Cipriani TR, Iacomini M, Gorin PA, Sasaki GL. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J Pharm Biomed Anal.* 2008;47(1):59–67.
28. González AG, Alvarenga NL, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Bazzocchi IL, Moujir L. Structure and absolute configuration of triterpene dimers from *Maytenus scutioides*. *Tetrahedron.* 1996;52(28):9597–9608.
29. De León L, López MR, Moujir L. Antibacterial properties of zeylasterone, a triterpenoid isolated from *Maytenus blepharodes*, against *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Res.* 2010;165(8):617–626.
30. González AG, Alvarenga NL, Ravelo AG, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Canela NJ, et al. Antibiotic phenol nor-triterpenes from *Maytenus canariensis*. *Phytochemistry.* 1996;43(1):129–132.
31. Madrigal RV, Zilkowski BW, Jr CRS. Structure-activity relationships among maytansinoids in their effect on the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *J Chem Ecol.* abril de 1985;11(4):501-6.
32. Chavez H, Estevez-Braun A, Ravelo AG, González AG. Friedelane triterpenoids from *Maytenus macrocarpa*. *J Nat Prod.* 1998;61(1):82–85.
33. Chávez H, Estévez-Braun A, Ravelo AG, González AG. First examples of dammarane triterpenes isolated from Celastraceae. *Tetrahedron.* 1997;53(18):6465–6472.
34. Queiroga CL, Silva GF, Dias PC, Possenti A, de Carvalho JE. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 β -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *J Ethnopharmacol.* 2000;72(3):465–468.
35. Chavez null, Callo null, Estevez-Braun null, Ravelo null, Gonzalez null. Sesquiterpene polyol esters from the leaves of *maytenus macrocarpa*. *J Nat Prod.* noviembre de 1999;62(11):1576-7.
36. Chávez H, Rodríguez G, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Estévez-Reyes R, González AG, et al. Macrocarpins A–D, new cytotoxic nor-triterpenes from *Maytenus macrocarpa*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2000;10(8):759–762.
37. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The Human MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res Mol Mech Mutagen.* 16 de julio de 1999;428(1–2):271-83.
38. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 20 de noviembre de 2000;455(1-2):81-95.

39. HUMN - Home [Internet]. [citado 12 de mayo de 2016]. Recuperado a partir de: <http://ehsdiv.sph.berkeley.edu/holland/humn/>
40. Matter B, Schmid W. Trenimon-induced chromosomal damage in bone-marrow cells of six mammalian species, evaluated by the micronucleus test. *Mutat Res.* agosto de 1971;12(4):417-25.
41. Fenech M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today.* 15 de noviembre de 2002;7(22):1128-37.
42. Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen.* 1991;18(4):277-91.
43. Dorn C.G., Kraemer D.C. Bovine embryo grading. Texas AMU University College of Veterinary Medicine, Department of Physiology and Pharmacology; 1987.
44. Baczkowski T, Kurzawa R, Głabowski W. Methods of embryo scoring in in vitro fertilization. *Reprod Biol.* marzo de 2004;4(1):5-22.
45. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res.* febrero de 1975;31(1):9-15.
46. Benavides V, D'Arrigo G, Pino J. Efecto del extracto acuoso de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) en embriones preimplantacionales de ratón. *Rev Peru Biol.* diciembre de 2010;17(3):381-4.
47. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet]. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011 [citado 27 de noviembre de 2015]. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
48. Arencibia DF, Rosario LA, Suárez YE, Delgado L. Frecuencia espontánea en inducida de micronúcleos transplacentarios en ratas Sprague Dawley. *InVet.* junio de 2011;13(1):53-61.
49. Porter A., Singh G. Trasplacentar teratogenesis and mutagenesis in mouse fetuses treated with Cyclophosphamide. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1988;8(4):191-203.
50. Nozaki H, Suzuki H, Hirayama T, Kasai R, Wu R-Y, Lee K-H. Antitumour triterpenes of *Maytenus diversifolia*. *Phytochemistry.* 1986;25(2):479-485.
51. D'Cruz SC, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP. Effects of plants and plant products on the testis. *Asian J Androl.* julio de 2010;12(4):468-79.
52. Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J. Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci CMLS.* octubre de 2008;65(19):2979-99.

53. Tiedemann RE, Schmidt J, Keats JJ, Shi C-X, Zhu YX, Palmer SE, et al. Identification of a potent natural triterpenoid inhibitor of proteasome chymotrypsin-like activity and NF-kappaB with antimyeloma activity in vitro and in vivo. *Blood*. 23 de abril de 2009;113(17):4027-37.
54. Gandhi M, Lal R, Sankaranarayanan A, Sharma PL. Post-coital antifertility action of *Ruta graveolens* in female rats and hamsters. *J Ethnopharmacol*. agosto de 1991;34(1):49-59.
55. Emmens CW. Antifertility Agents. *Annu Rev Pharmacol*. 1970;10(1):237-54.
56. Denker H-W. Cell Biology of Endometrial Receptivity and of Trophoblast-Endometrial Interactions. En: Glasser SR, Mulholland J, Psychoyos A, editores. *Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions* [Internet]. Springer US; 1994 [citado 4 de febrero de 2016]. p. 17-32. Recuperado a partir de: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-1881-5_3

ANEXOS

Figura 1: Constancia de Identificación Botánica

 **Graciela Vilcapoma Segovia de Andía**
Bióloga
Colegio de Biólogos del Perú 811

CONSTANCIA

Co-V-060-013

La que suscribe, Bióloga Graciela Vilcapoma Segovia de Andía – C.B.P. 811, habilitada para la Identificación Taxonómica de Plantas, inscrita en el Registro N° 12, deja constancia que:

Examinados los especímenes de “chuchuhuasi” de cuyos tallos se han obtenido **100 Kg.** de cortezas enteras; estos han sido determinados como: ***Maytenus macrocarpa* (R. & P.) Bricquet.**

Se expide la presente a solicitud de la empresa: **PROMO AGRO EXPORT S.A.C.**, con R.U.C. N° 20514915645, para los fines que estime convenientes.

Lima, 07 de febrero del 2013.

 
GRACIELA VILCAPOMA SEGOVIA
BIOLOGA

Calle Fátima N° 193, III Zona – El Agustino ■ 439-8625 E-mail: g_vilcapoma@hotmail.com

Figura 2: Actas de aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE APROBACIÓN

PROYECTO: EFECTO IN VIVO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Maytenus macrocarpa*, "CHUCHUHUASI" SOBRE EMBRIONES NO IMPLANTADOS DE RATÓN.

INVESTIGADOR SOLICITANTE: Gustavo Adolfo Valdivieso Díaz

INSTITUCION O LUGAR DE EJECUCION: Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo

FECHA: 11 DE MARZO DEL 2014

En Sesión Ordinara del jueves 20 de mayo del 2014, se reunieron los miembros del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (RD N° 435-D-FCB). Este Comité acoge los Principios Directrices Internacionales para la Investigación Biomédica que implique el Uso de Animales, CIOMS 1985, los Procedimientos para el Uso de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Perú, así como los aspectos considerados de importancia relacionados con las Buenas Prácticas del Cuidado y Manejo del Animal de Laboratorio, ratón, del Instituto Nacional de Salud, Perú; para evaluar los aspectos éticos inherentes a la investigación titulada: EFECTO IN VIVO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Maytenus macrocarpa*, "CHUCHUHUASI" SOBRE EMBRIONES NO IMPLANTADOS DE RATÓN. presentada por el Sr. Gustavo Adolfo Valdivieso Díaz

Este Comité certifica que las medidas tomadas para reducir el estrés, disconfort y dolor de los animales utilizados.

En virtud de las consideraciones expuestas el Comité otorga **opinión favorable** con las observaciones que se describen a continuación, solicitando al Investigador Responsable que levante las observaciones que se le hacen.

OBSERVACIONES

1. No Justifica el número de animales a utilizar mediante la determinación estadística del tamaño muestral.
2. No describe los procedimientos a los que serán expuestos los animales durante su estudio, en lo referente a:
 - a. No justifica el Método de eutanasia propuesto.
 - b. No indica procedimientos para la eliminación de los animales que se han sometido a eutanasia.

Esta investigación será supervisada o revisada nuevamente en el momento que este Comité así lo considere.

Av. Venezuela cdra. 34 s/n, Ciudad Universitaria
Apartado Postal 11-0058, Lima 11- Perú

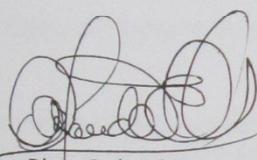
Teléfono: 619-7000 anexo 1502
Fax: 619-7000 anexo 1509

COMPROMISOS

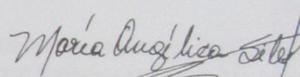
El Investigador deberá informar por escrito a este Comité

- a) Cualquier cambio que se proponga introducir a este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité.
- b) Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos de investigación (animales) y el investigador.
- c) Cualquier evento adverso serio, al día siguiente hábil, mediante comunicación con la secretaría técnica de este Comité.
- d) La terminación prematura o la suspensión del proyecto explicando las razones para esto.
- e) Resultados de avances, cada 6 meses y el resultado final de la investigación.

Lima, 22 de Mayo de 2014



Blgo. Rolando Estrada Jiménez
Presidente



Blga. María Siles Vallejos
Secretaria



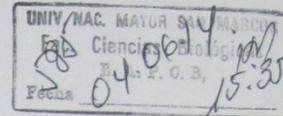
UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
"Carreras Profesionales Acreditadas Internacionalmente"

Lima, 02 de Junio de 2014

Señor Director
JOSÉ LUIS RAFAEL PINO GAVIÑO
Director de la Escuela Académico Profesional de
Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Presente.-



Ref.: Oficio N° 094- EAPCB-FCB-2014

De mi consideración:

Es grato dirigirme a Usted para saludarlo atentamente y en atención al oficio de la referencia remitir el acta correspondiente a la tesis:

1. "Efecto *in vivo* del extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa* "chuchuwasi" sobre embriones no implantados de ratón"; del señor GUSTAVO ADOLFO VALDIVIESO DIAZ.

Sin otro particular, aprovecho de la presente para reiterar los sentimientos de mi estima personal.

Atentamente,

Bigo. ROLANDO V. ESTRADA JIMENEZ
Pdte. De la Comisión de Ética

Av. Venezuela cdra. 34 s/n, Ciudad Universitaria
anexo 1502
Apartado Postal 11-0058, Lima 11- Perú
anexo 1509

Teléfono: 619-7000

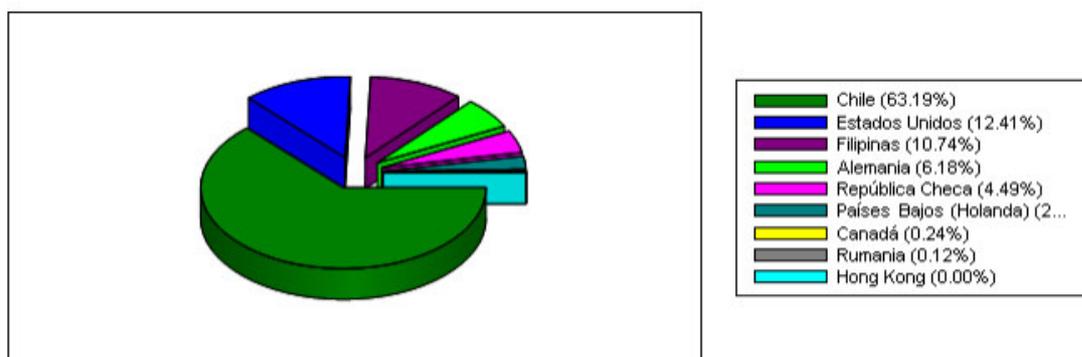
Fax: 619-7000

Cuadro N°1: Exportación de *Maytenus macrocarpa*

Datos de Exportación de Plantas Medicinales Amazónicas						
Planta Medicinal	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Chancapiedra	---	1.467,77	615,59	13.756,15	21.861,12	8.356,73
Chuchuhuasi	---	---	---	1.081,46	2.887,97	1.020,43
Copaiba	---	---	---	1.081,46	2.887,97	1.020,43
Hercampure	---	---	---	14.315,42	6.391,46	5.306,46
Sangre de grado	10.917,57	10.110,64	16.240,76	34.573,57	33.440,01	9.151,88
Uña de gato	148.437,05	223.255,15	212.439,84	234.166,01	219.952,22	80.915,49

Fuente: Ministerio del Ambiente – Programa Nacional de Promoción de Biocomercio

Cuadro N°2: Exportación de *M. macrocarpa* según sus principales mercados en 2015



Cuadro N°3: Formación de micronúcleos

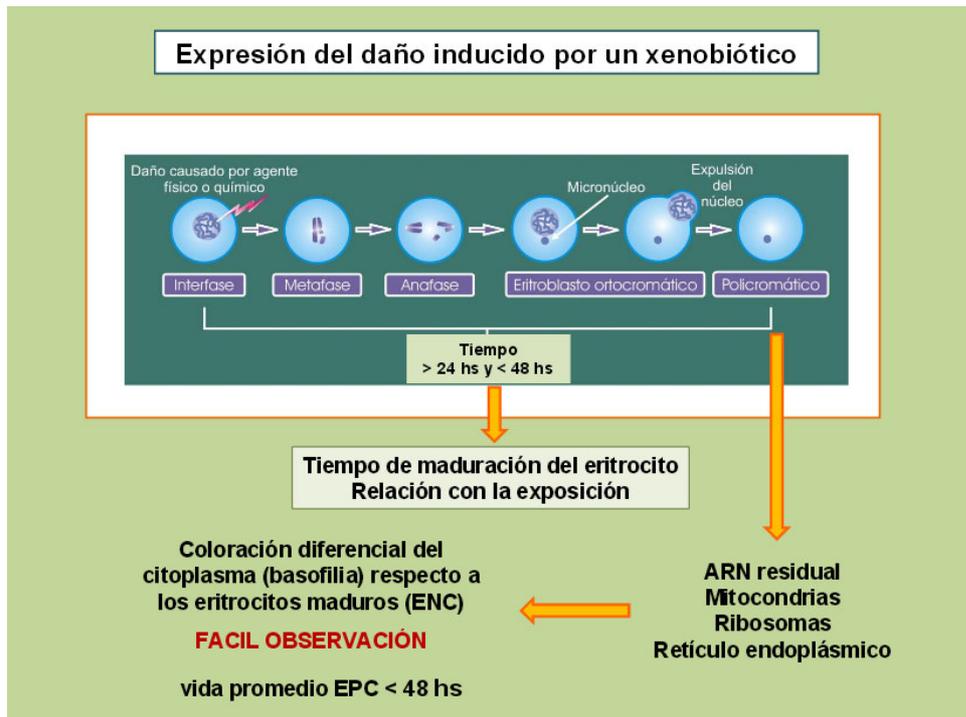
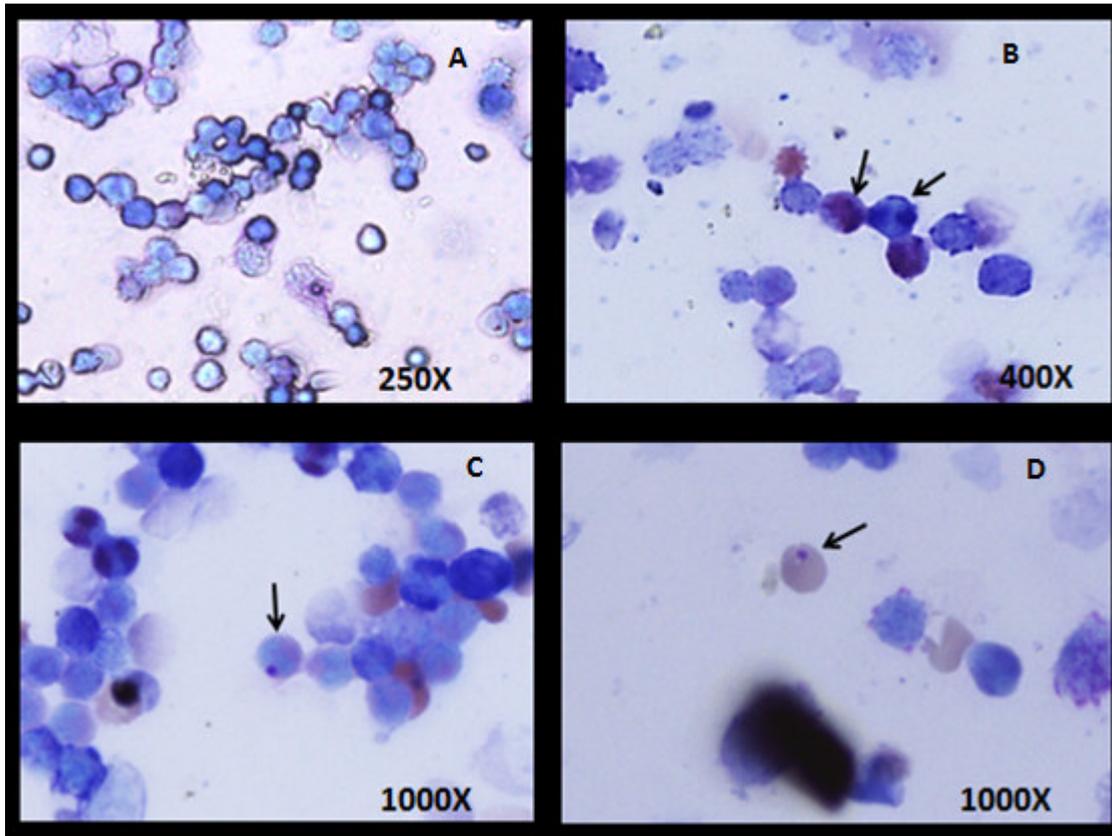


Gráfico presentado por la Dr. Marcela López Nigro en el XVI Congreso Argentino de Toxicología y I Congreso Internacional de Toxicología de la Infancia y la Adolescencia. Disponible en: http://www.ataonline.org.ar/stop/pdf/7b_mlopez.pdf

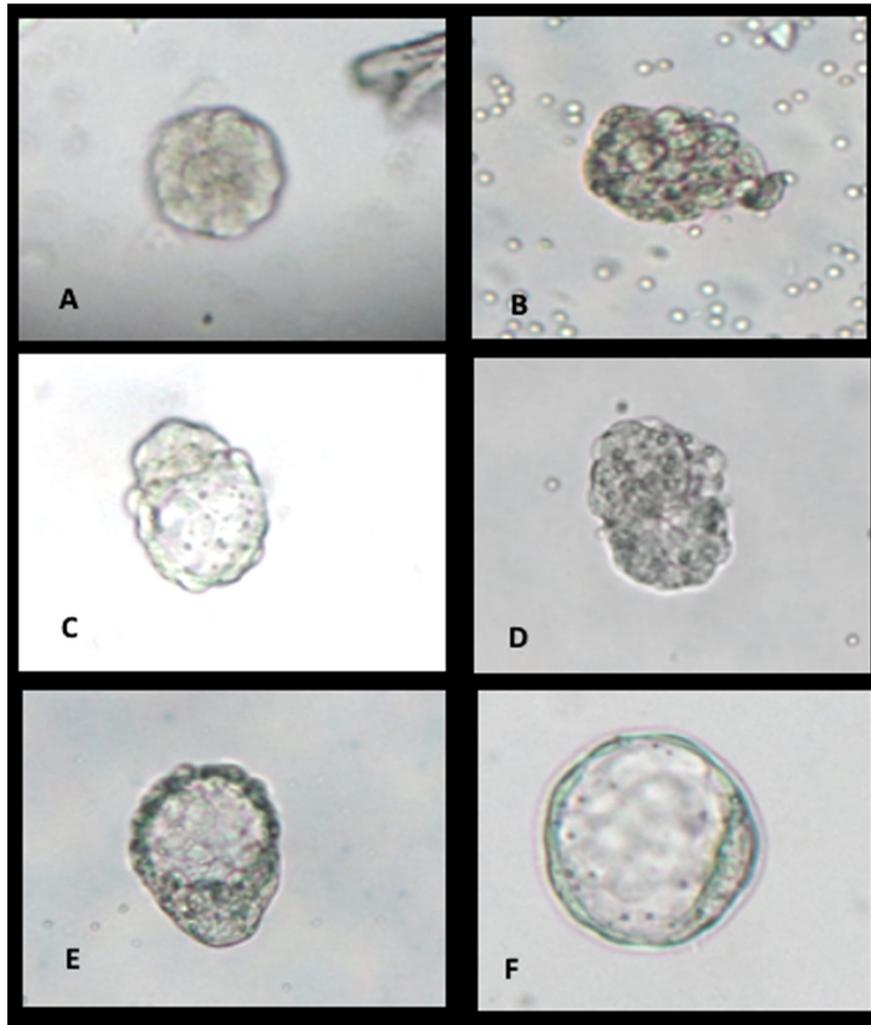


Fotografía N°1: Tapón vaginal (flecha) observado a la mañana siguiente post-copula. Tomado en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM



Fotografía N°1 Evaluación de Micronúcleos³ A: Vista panorámica de células de la medula osea de raton
 B: eritrocito policromático (EPC) en azul y eritrocito monocromático (EMC) en rosado. C y D: Eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMs) .

³ Micronúcleos observados en microscopio **Motic BA210** en el Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo..



Fotografía N°2 Gradación de embriones⁴ A: Mórula compacta grado 1. B: Mórula compacta Grado 4. C: Blastocisto temprano grado 1. D: Blastocisto temprano grado 3, E: Blastocisto intermedio grado1, F: Blastocisto Expandido grado 1

⁴ Embriones evaluados en la investigación, se presenta el estadio y grados detectados; observados en microscopio **Motic BA210** en el Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo