T
615.907
R74

NO SALE A DOMICILIO

"UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA"

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

TÍTULO:

"EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE CINCO ESPECIES MEDICINALES DE USO POPULAR EN EL PERÚ"

Tesis presentado por:

Bach. FBQ.: Rodríguez Chávez, Edgardo

Bach. FBQ.: Almeida Amasifuen Sergio Orlando

Para optar el titulo profesional de:

QUIMICO FARMACEUTICO

Asesor: Blgo. Felipe Ríos Isern

Coasesor: Q.F. Ernesto Nina Chora

IQUITOS – PERU

2009

NO SALE A DOMICILIO

"UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA"

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

TESIS

"EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE CINCO ESPECIES MEDICINALES DE USO POPULAR EN EL PERÚ"

AUTORES : Bach. FBQ. Rodríguez Chávez, Edgardo
Bach. FBQ. Almeida Amasifuen Sergio Orlando

ASESOR : Blgo. Felipe Ríos Isern

COASESOR : Q.F. Nina Chora Ernesto

COLABORADORES : Dr. José Aranda Ventura
Ing. Jorge Isaac Villacrés Vajello

Univ. Nacional de la Amazonia Peruana
BIBLIOTECA CENTRAL
Iquitos - Perú
00038

DURACION : 5 meses

IQUITOS-PERÚ

2009

Universidad Nacional de la Amazonia Peruana
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Carretera Zungarococha- Nina Rumi
San Juan – Loreto – Perú

Año de la Unión Nacional frente a la Crisis Externa"

ACTA DE SUSTENTACION

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los DIECINUEVE días del mes de OCTUBRE del dos mil nueve, siendo las 09.10am horas, el Jurado de Tesis designado según Resolución de Coordinación Nª 142-2008-FFB-UNAP, integrado por los señores docentes que a continuación se indica:

- Q.F. Luis Alberto Vilchez Alcalá — Presidente
- Ing. Gladys Cárdenas Cárdenas — Miembro
- Q.F. Carlos Contreras Licetti — Miembro

Se constituyeron en las instalaciones del Laboratorio Nº 4 de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de la tesis Tiulada **"EVALUACIÓN DEL POTENCIAL GENOTÓXICO DE CINCO ESPECIES MEDICINALES DE USO POPULAR EN EL PERÚ",** presentado por los Bachilleres Sergio Orlando Almeida Amasifuen y Edgardo Rodríguez Chávez, para optar el **TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO,** que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, de acuerdo a Ley Universitaria Nº 23733 y el Estatuto General de la UNAP vigente.
Luego de haber escuchado con atención la exposición de los sustentantes y habiéndose formulado las preguntas necesarias, las cuales fueron respondidas: en forma satisfactoria.

El Jurado llegó a la siguiente conclusión:
1. La tesis ha sido Aprobada por excelencia.
2. Observaciones: Ninguna

Siendo las 10.05am, se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de Tesis, felicitándoseles a los sustentantes por su excelente exposición.

Q.F. Luis Alberto Vilchez Alcalá
Presidente

Ing. Gladys Cárdenas Cárdenas
Miembro

Q.F. Carlos Contreras Licetti
Miembro

Evaluación del Potencial Genotóxico de Cinco Especies Medicinales de uso Popular en el Perú.

Bach. Edgardo Rodríguez Chávez, Bach. Sergio O. Almeida Amasifuen

Resumen

Se realizó la Evaluación Genotóxica de los extractos acuosos liofilizados de *Berberis vulgaris L* (Agracejo); *Desmodium molliculum* (HBK) D.C. (Manayupa); *Schukurhia pinnata var. Octarristata* (Canchalagua); *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris. (Hercampuri); y *Tiquilia paranychioides* (Flor de arena). Para ésta evaluación se utilizó el ensayo de anomalías en la cabeza de los espermatozoides del ratón. El método empleado fue descrito por Wyrobek & Bruce (1975). Como modelo biológico se utilizaron ratones albino machos cepa Balb/c-CNPB de 6 a 8 semanas de edad con pesos entre 20 – 30g. Se establecieron siete grupos experimentales, conformado por siete ratones por grupo, cinco grupos tratados con los extractos a la dosis 1600 mg/Kg., dos grupos controles (positivo y negativo); los tratados con los extractos y el control negativo (solución salina al 0.9%) fueron administrados por vía oral y el control positivo por vía intraperitonial.

Al final de los 35 días, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, en seguida se extrajeron los testículos y epidídimos y fueron pesados; los epidídimos se colocaron en solución salina y triturada hasta obtener una solución blanquecina que fueron coloreados con eosina al 1%. Se realizó extendido en láminas debidamente codificadas. Finalmente se procedió al conteo de al menos 1000 espermatozoides por animal y se clasificaron de acuerdo el criterio de Wyrobek y Bruce, basado en cabezas normales, amorfas, bananas y sin gancho. Los resultados obtenidos de la evaluación genotoxica indican que los extractos liofilizados de *Berberis vulgaris L* (Agracejo); *Desmodium molliculum* (HBK) D.C. (Manayupa); *Schukurhia pinnata var. Octarristata* (Canchalagua); *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris. (Hercampuri); y *Tiquilia paranychioides* (Flor de arena) a la dosis de 1600 mg/Kg., no mostraron daño significativo $p > 0.05$ a nivel de células germinales en comparación del grupo control positivo tratado con Ciclofosfamida que si mostró daño significativo $p < 0.05$.

Palabras claves: *Berberis vulgaris L; Desmodium molliculum* (HBK) D.C.; *Schukurhia pinnata* var. Octarristata; *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris.; *Tiquilia paranychioides*, Evaluación Genotoxica, células germinales.

Genotoxic Potential Evaluation of Medicinal Five Species of Popular use in Peru.

Adstract

A Genotoxic evaluation of the liofilized aqueous extract of *Berberis vulgaris L* (Agracejo); *Desmodium molliculum* (HBK) D.C. (Manayupa); *Schukurhia pinnata var. Octarristata* (Canchalagua); *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris. (Hercampuri); and *Tiquilia paranychioides* (Sand Flower). The method used was described by Wyrobek & Bruce (1975). Balb/c male mice from 6 to 8 weeks with weights between 20-30 g were used as biological models. Seven experimental groups were established, formed by seven mice per group, five groups treated with the extract with a dose of 1600 mg/kg., two control groups (positive and negative); the treated with the extracts and the negative control (0.9% saline solution) was sacrificed by cervical dislocation, then the mice testicles and epididymis were extracted and weighed, the epididymis were placed in saline solution and **triturados** until whitish solution that were colored with eosine 1%, then they were extenden on properly codified sheets.

Finally, we made the count of at least 1000 sperms by animal that were classified according Wyrobeck and Bruce criteria, based on normal heads, amorphous, banana and without hook.

Selon the results obtained from this genotoxic evaluation, the liofilized extracts of *Berberis vulgaris L* (Agracejo); *Desmodium molliculum* (HBK) D.C. (Manayupa); *Schukurhia pinnata var. Octarristata* (Canchalagua); *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris. (Hercampuri); and *Tiquilia paranychioides* (Sand Flower) in doses of 1600 mg/kg didn¨t show signicative damage $p > 0.05$ for germ cells comparing with the positive comtrol group treated with Ciclofosfamida that showed significative damage $p < 0.05$.

Key words: *Berberis vulgaris L*; *Desmodium molliculum* (HBK) D.C.; *Schukurhia pinnata var. Octarristata*; *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris.; *Tiquilia paranychioides*, Genotoxic evaluation, germ cells.

Dedicatoria

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, por acompañarme en cada una de las locuras que he emprendido y ser siempre mis más fervientes hinchas

A mis padres, por todo lo que me han dado en esta vida, especialmente por sus sabios consejos y por estar a mi lado en los momentos difíciles.

A mi hermano Román, quien me acompañado en silencio con una compresión a prueba de todo.

A mis tíos por actuar siempre dispuestos a ayudarme.

A mi abuelita Emérita, quien desde el cielo me guía y estoy seguro que en estos momentos está orgulloso de mi.

A mis amigos, quienes se convirtieron en mi familia adoptiva en Iquitos Abias, Lenin, Laizamon, Paolo, Rubén, Sergio, Verónica y a la señora Rosa de Jesús por ayudarme en cada momento y hacerme sentir como en casa cuando lo necesité

♫ Siempre estarán en mi...esos buenos momentos que pasamos sin saber ♫

A mi Charin, simplemente por ser como es. Con todas su manías y defectos, con todo sus virtudes y bellezas. Gracias por inspirar mi poesía, caminar a milado durante todo este tiempo y mostrarme con una sonrisa, que el amor de verdad puede existir.

Bach. Edgardo Rodríguez Chávez

Agradecimiento

Cuando comencé a escribir los agradecimientos pensé que por descuido podía dejar a alguien importante fuera de la mención, por eso desde ya pido las disculpas correspondientes en caso de que suceda.

Antes que a todos quiero agradecer a Dios por darme las fuerzas necesarias en los momentos en que más las necesité y bendecirme con la posibilidad de caminar a su lado durante toda mi vida.

También quiero agradecer al Instituto de Medicina Tradicional-EsSalud por brindarnos las instalaciones para la ejecución del proyecto de tesis.

Quiero darles gracias a todos los profesores que hicieron de mi un buen profesional y una mejor persona.

En particular a mi profesor guía, el Biólogo Felipe Ríos Isern y al Químico Farmacéutico Ernesto Nina Chora quienes nos orientaron durante la realización de la tesis, gracias por sus concejos durante el tiempo que duro esta tesis. ¡Vamos que se puede!

No puedo dejar de agradecer al Ing. Jorge Isaac Villacrés Vallejo, por colaboración oportuna y desinteresada en la ejecución de la tesis.

Quiero agradecer además a mi compañera y amiga Verónica, quien destino parte importante de su tiempo para construir los cuadros estadísticos.

Agradecer a mi primo Luis, quien destino parte importante del tiempo en el uso de su computadora para elaborar la redacción de la tesis.

A todos nuestros amigos y compañeros de estudio por su amistad y apoyo.

Por ultimo quiero agradecer a mis padres Manuel y Maritza; Román y Manuel "hermanos" y a mi abuelito Héctor por hacer mas grata mi permanencia en la universidad.

DEDICATORIA

A DIOS por estar presente siempre en los momentos cuando todo parecía terminar, por enseñarme que con perseverancia se puede alcanzar las metas.

Con amor y agradecimiento a mis padres Clara de Jesús Amasifuén Piña y Orlando Almeida Peso, por darme la vida y apostar por mí, apoyándome en mi carrera y por ser ejemplo de esfuerzo y dedicación.

A mi familia por su apoyo incondicional en mi formación personal.

Bach. Sergio O. Almeida Amasifuen

Agradecimiento

A la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana y a la facultad de farmacia y bioquímica por ser mi casa de formación y desarrollarme como profesional. Muchas gracias

Al Instituto de Medicina Tradicional IMET-EsSalud, por facilitarme sus instalaciones, equipos y material necesario, para desarrollar mí proyecto de tesis. Muchas gracias

Al Blgo. Felipe Ríos Isern, asesor de tesis, por su valiosa instrucción y por brindarme su conocimiento para desarrollar mi proyecto de tesis. Muchas gracias

Al Q.F. Ernesto Nina Chora, asesor de tesis, por su aporte en la corrección de mi proyecto de tesis. Muchas gracias

Al Laboratorio de Investigación en Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía LIIPNA-UNAP por brindarnos su apoyo en la liofilización del extracto en estudio. Muchas gracias

A los miembros del jurado examinador por su exigencia en la redacción y revisión del proyecto de tesis. Muchas gracias

A todos los colaboradores que apoyaron en la realización de este proyecto de investigación Muchas gracias

Índice de contenido

Paginas

Acta de sustentación..... i
Resumen..... ii
Dedicatoria..... iv
Agradecimiento..... v

CAPITULO I

1.1. INTRODUCCIÓN..... 1
1.2. PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA..... 3
1.3. OBJETIVOS..... 6
1.3.1. Objetivo general..... 6
1.3.2. Objetivos específicos..... 6

CAPITULO II

2.1. ANTECEDENTES..... 8

2.2. AGRACEJO
2.2.1. Taxonomia..... 11
2.2.2. Sinonimias..... 11
2.2.3. Nombres populares..... 11
2.2.4. Descripción botánica..... 12
2.2.5. Hábitat y distribución..... 13
2.2.6. Ubicación en el Perú..... 12
2.2.7. Usos medicinales..... 13
2.2.8. Composición química..... 13
2.2.9. Contraindicaciones y precauciones..... 14
2.2.10. Indicaciones terapéuticas..... 14

2.3. MANAYUPA
2.3.1. Taxonomia..... 15
2.3.2. Sinonimias..... 15
2.3.3. Nombres populares..... 15
2.3.4. Descripción botánica..... 15
2.3.5. Hábitat y distribución..... 15
2.3.6. Ubicación en el Perú..... 16
2.3.7. Bioagricultura..... 16
2.3.8. Usos medicinales..... 16
2.3.9. Composición química..... 16
2.3.10. Farmacobotánica y Farmacognosia..... 17

4.3.11. Farmacología experimental..... 16
2.3.12. Contraindicaciones y precauciones..... 18
2.3.13. Indicaciones terapéuticas..... 18
2.3.14. Toxicología..... 18

2.4. CANCHALAGUA
2.4.1 Taxonomia..... 19
2.4.2. Nombres populares..... 19
2.4.3. Descripción botánica..... 19
2.4.4. Hábitat y distribución..... 19
2.4.5. Ubicación en el Perú..... 20
2.4.6. Bioagricultura..... 20
2.4.7. Usos medicinales..... 20
2.4.8. Composición química..... 20
2.4.9. Farmacobotánica y Farmacognosia..... 20
2.4.10. Farmacología experimental..... 21
2.4.11. Indicaciones terapéuticas..... 21

2.5. HERCAMPURI
2.5.1. Taxonomia..... 22
2.5.2. Sinonimias..... 22
2.5.3. Nombres populares..... 22
2.5.4. Descripción botánica..... 22
2.5.5. Hábitat y distribución..... 23
2.5.6. Ubicación en el Perú..... 23
2.5.7. Bioagricultura..... 23
2.5.8. Usos medicinales..... 23
2.5.9. Composición química..... 23
2.5.10. Farmacobotánica y Farmacognosia..... 24
2.5.11. Farmacología experimental..... 24
2.5.12. Contraindicaciones y precauciones..... 25
2.5.13. Indicaciones terapéuticas..... 26
2.5.14. Toxicología..... 26

2.6. FLOR DE ARENA
2.6.1. Taxonomia..... 26
2.6.2. Sinonimias..... 26
2.6.3. Descripción botánica..... 27
2.6.4. Hábitat y distribución..... 27
2.6.5. Ubicación en el Perú..... 27
2.6.6. Usos medicinales..... 27
2.6.7. Composición química..... 27
2.6.8. Contraindicaciones y precauciones..... 27
2.6.9. Indicaciones terapéuticas..... 28

2.7. TOXICOLOGÍA GENÉTICA..... 29

2.8. ESPERMATOGÉNESIS..... 33
2.8.1. Fases de la Espermatogénesis..... 34
2.8.2. Estructura del Espermatozoide..... 36
2.8.3. Alteraciones Morfológicas del Espermatozoide del ratón..... 36

2.9. ENSAYO DE LA MORFOLOGÍA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DEL RATÓN..... 37

2.10. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CICLOFOSFAMIDA..... 39

2.11. HIPÓTESIS..... 42

2.12. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES..... 43

CAPITULO III

3.1. METODOLOGÍA..... 45
3.1. Tipo de investigación..... 45
3.2. Diseño de la investigación..... 46
3.2.1. Evaluación genotoxica..... 46

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA..... 47
3.3.1. Población vegetal..... 47
3.3.1.1. Muestra vegetal..... 47
3.3.2. Población animal..... 48
3.3.2.1. Muestra animal..... 48

3.4. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS..... 49
3.4.1. Recolección de la Muestra Vegetal..... 49
3.4.2. Identificación taxonómica la muestra vegetal..... 49
3.4.3. Obtención del Extracto Acuoso Liofilizado..... 50
3.4.4. Preparación del Extracto Liofilizado para ser administrados a los ratones... 51
3.4.5. Preparación del Control Negativo (Solución salina 0.9%)..... 53
3.4.6. Preparación del Control Positivo (Ciclofosfamida)..... 54
3.4.7. Ensayo de Anomalías en la Cabeza del Espermatozoide del Ratón..... 56

3.5. INSTRUMENTOS..... 59
3.5.1. Material vegetal..... 59
3.5.2. Material animal..... 59
3.5.3. Materiales de vidrio..... 59
3.5.4. Material plástico y metal..... 59
3.5.5. Reactivos..... 60
3.5.6. Equipos..... 61
3.5.7. Materiales de bioseguridad..... 61

3.6. ANÁLISIS DE DATOS..... 62

3.7. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO..... 63

CAPITULO IV

4.1. RESULTADOS 67

4.2. DISCUSIÓN..... 74

4.3. CONCLUSIONES..... 77

4.4. RECOMENDACIONES..... 79

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 80

4.6. ANEXOS..... 88

ÍNDICE DE FIGURA

Figura A: Mecanismo De Acción De La Ciclofosfamida (Primer mecanismo). Pág. 39

Figura B: Mecanismo De Acción De La Ciclofosfamida (Segundo mecanismo). Pág. 40

Figura C: Mecanismo De Acción De La Ciclofosfamida (Tercer mecanismo). Pág. 41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nº 01: Ejemplos de sustancias químicas que muestran genotoxicidad en células humanas. Pág. 32

Tabla Nº 02: Recuento total de espermatozoides Normales y Anormales en ratones por grupo experimental. Pág. 67

Tabla Nº 03: Porcentaje de Promedios y Desviación Estándar de Espermatozoides Normales y Anormales en ratones por grupo experimental. Pág. 68

Tabla Nº 04: Recuento total de espermatozoides de tipo amorfo banana y sin gancho de ratones por grupo experimental. Pág. 69

Tabla Nº 05: Porcentaje de Promedios y Desviación Estándar de espermatozoides Anormales en ratones por grupo experimental. Pág. 70

Tabla Nº 06: Porcentaje de Promedios y Desviación Estándar de los Pesos de testículos y epidídimos de los ratones tratados con los extractos acuosos liofilizados a dosis 1600 mg/kg. Pág. 73

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico Nº 01: Recuento de Espermatozoides normales por grupo Experimental. Pág. 71

Gráfico Nº 02: Recuento de Espermatozoides anormales por grupo Experimental. Pág. 72

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo Nº 01: Estructura del Espermatozoide. Pág. 88

Anexo N° 02: Tabla de Dosificación. Pág. 89

Anexo Nº 03: Proceso de La Evaluación Genotoxica mediante El método de Anomalías en La cabeza del espermatozoide del ratón. Pág. 90

Anexo Nº 04: Morfología de La Cabeza Del Espermatozoide Del ratón. Pág. 91

Anexo Nº 05: Certificado de identificación taxonómica de La especie vegetal. Pág. 92

ÍNDICE DE FOTOS

FOTO Nº 01: Selección y Marcaje de los ratones macho. Pág. 93

FOTO Nº 02: Pesaje de ratones. Pág. 94

FOTO Nº 03. Administración de las Sustancias. Pág. 95

FOTO Nº 04. Sacrificio de los animales por Dislocación cervical. Pág. 96

FOTO Nº 05. Peso de los testículos y epidídimos. Pág. 96

FOTO Nº 06. Adición de Solución salina en placas conteniendo los epidídimos. Pág. 97

FOTO Nº 07. Preparación de la solución espermática. Pág. 98

FOTO Nº 08. Coloración de la solución espermática. Pág. 98

FOTOS Nº 09. Extendido de las láminas. Pág. 98

FOTOS Nº 10. Lectura de las láminas. Pág. 99

FOTO Nº 11. Espermatozoides normales. Pág. 100

FOTO Nº 12. Espermatozoide amorfo. Pág. 100

FOTO Nº 13. Espermatozoide sin gancho. Pág. 101

FOTO Nº 14. Espermatozoide banana. Pág. 101

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

La evaluación del riesgo de los productos químicos para el hombre conlleva la realización de ensayos toxicológicos que incluyen los de genotoxicidad. Las actuales pruebas de rutina de genotoxicidad tienen al menos 20 años de desarrollo, durante los cuales, numerosos ensayos han sido introducidos y desarrollados. Hoy está claro que ningún ensayo por sí sólo es capaz de detectar todos los agentes genotóxicos, por tanto el procedimiento usual es ejecutar una batería estándar de pruebas in vitro e in vivo. Los grupos de trabajo de la Unión Europea (EU), la Organización Económica de Cooperación y Desarrollo (OECD) y, recientemente, la Conferencia Internacional de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos de Uso Humano (ICH) han definido el uso de baterías de ensayos de genotoxicidad [1]. En el ámbito internacional, la evaluación genotóxica de nuevos medicamentos es un requisito de carácter obligatorio [2,3,4] y, aunque no existe un consenso generalizado sobre qué tipos y cantidad de ensayos de genotoxicidad deben realizarse, existen criterios coincidentes para clasificar en genotóxicos o no, los productos químicos, de acuerdo a los resultados obtenidos mediante dichos ensayos [5].

Los extractos de las plantas superiores constituyen mezclas complejas que contienen un gran número de sustancias con propiedades mutagénicas [6] y carcinogénicas, 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 [7].

La medicina tradicional es una realidad presente en todo el mundo como su nombre indica, forma parte del patrimonio cultural de cada país y emplea practicas que se han transmitido de una generación a otra, desde centenares de años antes del desarrollo de nuestra medicina actual.[8,9]

En la actualidad el uso de la flora, continúa proveyendo un recurso excepcionalmente vasto en productos biológicamente activos, que puedan ser útiles por si, o bien puedan servir como fuente natural de prototipos químicos para el desarrollo de derivados modificados (con actividades incrementadas y/o toxicidad reducida) [9,10]

La OMS (Organización Mundial de la Salud) y muchas organizaciones prestigiosas fomentan y financian planes de desarrollo con el objeto de fundamentar el uso medicinal de las plantas, validadas con el debido rigor científico, sobre todo en los aspectos relacionados a su efectividad e inocuidad [9,10].

1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En el Perú y también en toda América Latina se hace cada día mas frecuente el uso de drogas vegetales y fitomedicinas, como parte integral de la medicina convencional, en estos casos basándose en la información de la medicina tradicional, ha sido posible para la medicina convencional validar la acción terapéutica y establecer los correctos usos de los recursos vegetales.

Muchas de estas plantas en la actualidad cumplen un rol muy importante en el tratamiento de muchas patologías, tanto a nivel popular como galénico, así pues los pobladores de nuestra región[11] aprovechan los principios activos del *Berberis vulgaris L* (Agracejo) cuyos usos tenemos, como colerético, antipirético, laxante.[12]; *Desmodium molliculum* (Manayupa), al cual le atribuyen bondades como poseer actividad depurativa, antiasmática, antiinflamatorio, hepatoprotector, entre otros [13]; *Gentianella alborosea* (Hercampuri), el cual es recomendado como coadyuvante en el tratamiento de reducción de peso y colesterol, también es utilizado para tratar afecciones hepáticas y como purificador de la sangre, tiene efecto colerético, colagogo y diurético[14]; *Schukurhia pinnata* var. Octarristata (Canchalagua) cuyos usos medicinales esta indicado como antiinflamatoria, depurativa; usada en enfermedades reumáticas, inflamaciones de la piel, alergia [15]; y *Tiquilia paranychioides* (Flor de Arena), cuyos usos medicinales esta indicada como depurativo del sistema neuroglandular, de leve acción diurética y sedante, elimina el exceso de ácido úrico en la sangre, a menudo producido por el excesivo consumo de proteínas animales. También es útil en casos de artritis úrica y de intoxicación por alimentos. Se usa en enfermedad de gonorrea [16].

Estas especies como esta indicado de acuerdo al conocimiento tradicional, presentan bondades para la resolución de problemas de salud y a la vez se desconocen sus probables efectos genotóxicos como consecuencia de su consumo, dependiendo generalmente entre otros factores de las dosis de administración y considerando algunos antecedentes bibliográficos referidos a otras especies.

Una rama de la Toxicología, la Genética Toxicológica, tiene como principal objetivo la detección de aquellos agentes con actividad mutagénica, los cuales podrían resultar potencialmente carcinogénicos [17], estos agentes se denominan genotóxicos y ejercen su acción sobre el material hereditario de las células de los organismos vivos, es decir el ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico(RNA) según el organismo de que se trate, de esta manera provocan cambios en la composición del genoma, habiéndose llegado a clasificar las mutaciones en tres grupos: mutaciones génicas o "puntuales", mutaciones cromosómicas o aberraciones cromosómicas estructurales y mutaciones genómicas o aberraciones cromosómicas numéricas. [18]

Los cambios en el material genético de los organismos vivos, causados por agentes químicos externos pueden originar diversos tipos de enfermedades en humanos [19], se ha observado una alta correlación entre la inducción de mutaciones por los compuestos en estudio y su capacidad de inducir procesos de transformaciones malignas (carcinogenicidad) en animales de experimentación [20]. Además se conoce que eventos mutagénicos están involucrados en la transformación celular ocurridas en las etapas iniciales de desarrollo del tumor. [21]

De ocurrir cambios en las células germinales de los organismos eucarióticos, se pueden originar mutaciones en la descendencia más cercana o puede transcurrir un

tiempo prolongado entre la exposición al compuesto genotóxico y la manifestación del daño provocado. [22]

Para llevar a cabo estos fines se realizan estudios de toxicidad con el objetivo de evaluar los efectos dañinos o no deseables que pudieran producirse en las condiciones de uso propuestas, determinando así su margen de seguridad para el empleo en humanos. [23, 24,25]

Con este objetivo se han desarrollado diversos sistemas de ensayo, que utilizan desde bacterias hasta mamíferos, e incluso cultivos de células humanas, los cuales se realizan a corto plazo; estos son económicos, fáciles de ejecutar, reproducibles y producen resultados en un corto período de tiempo, permitiendo obtener una evaluación rápida del potencial mutagénico de un compuesto dado. Dentro de estos ensayos a corto plazo se encuentra el de anomalías de la cabeza de espermatozoides del ratón.

¿Presentarán los extractos acuosos liofilizados del *Berberis vulgaris L* (Hojas); *Desmodium molliculum* (Hojas y tallos); *Schukurhia pinnata* var. Octarristata (Tallos y hojas); *Gentianella alborosea* (Planta entera) y *Tiquilia paranychioides* (Flores), efecto genotóxico a dosis de 1600mg/Kg. de peso corporal en células germinales mediante el ensayo in vivo de anomalías en la cabeza de espermatozoides de ratón?

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

- Determinar el potencial genotóxico de cinco especies vegetales de uso popular en el Perú.

1.3.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto genotóxico del extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Berberis vulgaris L*, a dosis de 1600 mg/kg/pc; en células germinales mediante el ensayo in vivo de anomalías en la cabeza del espermatozoide del ratón albino *Mus musculus* cepa Balb/C CNPB.
- Determinar el efecto genotóxico del extracto acuoso liofilizado de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (HBK) D.C, a dosis de 1600 mg/kg/pc; en células germinales mediante el ensayo in vivo de anomalías en la cabeza de espermatozoides de ratón albino *Mus musculus* cepa Balb/C CNPB.
- Determinar el efecto genotóxico del extracto acuoso liofilizado de las hojas y tallos de *Schukurhia pinnata* var. Octarristata, a dosis de 1600 mg/kg/pc; en células germinales mediante el ensayo in vivo de anomalías en la cabeza de espermatozoides de ratón albino *Mus musculus* cepa Balb/C CNPB.
- Determinar el efecto genotóxico del extracto acuoso liofilizado de la planta entera de *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris, a dosis de 1600 mg/kg/pc; en células germinales mediante el ensayo in vivo de anomalías en la cabeza de espermatozoides de ratón albino *Mus musculus* cepa Balb/C CNPB.

- Determinar el efecto genotóxico del extracto acuoso liofilizado de las flores de *Tiquilia paranychioides*, a dosis de 1600 mg/kg/pc; en células germinales mediante el ensayo in vivo de anomalías en la cabeza de espermatozoides de ratón albino *Mus musculus* cepa Balb/C CNPB.

CAPITULO II

2.1. ANTECEDENTES

Desde mediados de la década del 70, se fue haciendo cada vez mas evidente para los Toxicólogos, que una nueva rama de la Toxicología, la Genética Toxicológica, que acababa de iniciar un rápido avance como rama independiente, iba a constituir un elemento indispensable de las evaluaciones toxicológicas preclínicas de todos aquellos nuevos compuestos que se pretendía introducir en el ambiente humano. (33)

En un inicio, los toxicólogos ubicaron los ensayos de genotóxicidad en una categoría tan amplia como variada en su composición a la cual denominaron "pruebas especiales de toxicidad". Esta incluía estudios tan diferentes como de teratogenicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad, lo que provocó que no siempre, se comprendiera la diversidad de objetivos experimentales de cada una de ellas. (34)

Adicionalmente, el calificativo de "pruebas especiales" fue en ocasiones interpretado como pruebas opcionales, no obligatorias en la evaluación integral toxicológica de un compuesto químico.

Sin embargo muy pronto se fue haciendo evidente que estas pruebas "especiales" eran tan fundamentales y obligatorias en la evaluación toxicológica con las pruebas toxicológicas clásicas, subdivididas en categorías según su tiempo de duración en agudas, sub-crónicas y crónicas. (35)

Hoy en día esta denominación inicial de las pruebas de mutagenicidad en la categoría de "pruebas especiales", a sido cambiado, y en muchos países se les denomina "pruebas de genotóxicidad a corto plazo", y forman parte de las pruebas obligatorias en las evaluaciones toxicológicas de numerosos compuestos químicos, conjuntamente con el resto de las pruebas tradicionales toxicológicas, y según el caso, conjuntamente con las " pruebas a largo plazo" entre las que se encuentran las de carcinogenesis. [36]

Entre los primeros compuestos químicos a los que se regulo su obligatoria evaluación genotóxica entre los ensayos preclínicos, así como para su inclusión en los registros de medicamentos, se encontraron aquellos que presentaban interés farmacológico, ya que muy pronto se evidencio que algunos medicamentos que en un inicio fueron negativos en las pruebas de carcinogenicidad, resultaron ser genotóxicos. [37]

Así, desde 1975 comienzan aparecer las primeras legislaciones con este propósito, entre los primeros países que realizaron acciones concretas en esté sentido estuvieron Italia, Gran Bretaña, Estados Unidos y Canadá. Diversas organizaciones internacionales como la OMS, la OSD y el CAME entre otras también se pronunciaron en esta dirección y dictaron normativas para la evaluación preclínica de la genotóxicidad de los medicamentos, las cuales eran utilizadas como una guía por los países miembros. [38,39]

Una pregunta lógica que se hacen los genéticos toxicológicos frente a la existencia de tantos sistemas de ensayo para detectar genotóxicidad es cual será su verdadero valor relativo para evaluar la genotóxicidad de un compuesto dado.

Puede plantearse sin lugar a dudas que su valor relativo radicara en su poder para predecir los posibles efectos mutagénicos y/o carcinogénicos que el compuesto en estudio puede tener en humanos. Hoy en día se sabe que esto va a depender de muchos factores.

Entre los factores, que se consideran más importantes para el poder predictivo de un sistema de ensayo, esta su semejanza con las condiciones en Humanos. Mientras mas grande sea esta semejanza, mayor será su peso en la predicción de efectos mutagénicos y/o carcinogénicos. [40]

Hay una serie de consideraciones que permiten tener en cuenta este parámetro:

- Los ensayos de genotóxicidad "in vivo", tiene mayor peso a la hora de predecir daño genético en humanos, que los ensayos "in Vitro".
- Los ensayos con organismos eucarióticos tienen más peso que los realizados con organismos procarióticos.
- Los ensayos realizados con especies de mamíferos tienen mayor peso que los realizados con organismos que no sean mamíferos.

Otra consideración de carácter general pero que es necesario tener en cuenta para poder predecir los posibles efectos mutagénicos de los compuesto en estudio sobre humanos, es el tipo de célula (somática o germinal) que se este evaluando en el ensayo de genotóxicidad.

Sin en un momento determinado de la evaluación toxicológica se necesita conocer los efectos del compuesto en estudio sobre las células germinales, es evidente que tendrá mayor peso e importancia para la predicción de daño germinal en humanos, a aquellos tests que evalúen efectos mutagénicos en las células germinales en lugar de aquellos que miden efectos mutagénicos en las células somáticas. [41]

2.2. AGRACEJO

Berberis vulgaris

2.2.1. Taxonomia:

Familia: Berberidáceae

Genero: Berberis

Especie: vulgaris

2.2.2. Sinonimias:

Castellano: Agracillo, Berbero, Retamilla, Agracejo de España, Agracejo de Europa, Vinagrera, Cambrón; Catalán: Berberis, Coralet, Espinavineta; Vascuence: Berberis arrunt; Gallego: Berberiz, Arleira, Uva espin; Francés: Épine-vinette; Inglés: Barberry. [42]

2.2.3. Nombres populares:

Agracejo común, Agrazon, Garbazon, Vinagrera, Vinagreta. [43]

2.2.4. Descripción botánica:

Planta arbustiva, glabra, de hasta 2 m de altura, con tallos espinosos asurcados; los de un año son amarillentos, floridos, y los de más años son grisáceos. Las espinas, que son hojas modificadas, son de color pardo amarillento y son simples o con hasta 5 ramas; la espina central es la mayor, de hasta 30 mm, y las laterales menores, de hasta 25 mm. Las hojas, de 15 – 50 x 7 – 25 mm, son simples, fasciculadas, aparecen en la axila de las espinas y tienen forma elíptica, obovada u oblanceolada, con la base cuneada, sésil o con un corto pecíolo de hasta 20 mm, y el margen tiene 8 – 35 dientes en cada lado, aunque en ocasiones es entero o subentero.

Las flores aparecen en racimos alargados, de 25 – 50mm, entre 9 y 20 flores pedunculadas y bracteadas. Las flores son amarillas y miden entre 4 y 6mm de diámetro; el cáliz tiene 6 sépalos de consistencia petaloidea, dispuestos en dos verticilos: los internos de hasta 4.5 x 2.5 mm, de forma oval y enteros, mientras que los externos son mas pequeños. La corola consta de 6 pétalos también dispuestos en dos verticilos, que tienen dos glándulas conspicuas en la base; miden hasta 4 x 2 mm, son oblanceolados, de ápices escotado y más cortos o iguales que los sépalos internos. El androceo está formado por 6 estambres opuestos a los pétalos y el gineceo por un ovario que carece de estilo, y un estigma truncado, persistente en el fruto. El fruto es una baya de 5 – 9 x 3 – 4.5 mm, de forma oblonga, elipsoidal, de color rojo, generalmente pruinosa, con 2 simillas en el interior. Florece de mayo a julio. [44]

2.2.5. Hábitat y distribución:

Habita en gran parte de las zonas templadas y montañosas de Europa, Norte de África y Asia occidental, principalmente en terrenos secos y pedregosos. [15]

2.2.6. Ubicación en el Perú:

En el Perú se le encuentra en Cuzco y en la Sierra Central, se encuentra a 3300-3600 msnm. [42]

2.2.7. Usos medicinales:

Esta planta se ha usado en el tratamiento de muchas enfermedades, aunque la corteza es la parte que contiene más cantidad de principios activos. Se emplea hoy día como tónica de la vesícula biliar. La corteza y la raíz son antisépticas, astringentes, colagogas, hepáticas, purgantes, refrigerantes, estomáticas y tónicas. Las flores son antirreumáticas. La raíz de la corteza se usa como purgante en el tratamiento de la diarrea. [44]

2.2.8. Composición química:

Toda la planta, excepto los frutos, contiene alcaloides (2-3 %). El principal es la berberina, junto con la magnoflorina, berbamina, berberrubina y bervulcina. Frutos: Dextrosa, levulosa, ácidos cítrico, tartárico y málico, goma, pectosa. [42]

2.2.9. Contraindicaciones y precauciones:

Las mujeres embarazadas no deben utilizar esta planta, porque puede estimular las contracciones uterinas y provocar aborto.

Aunque se utiliza a veces para la diarrea en niños, debe ser utilizado solamente bajo supervisión de un médico calificado.

Las dosis altas tienen un efecto laxante de gran alcance. El berberis dilata los vasos sanguíneos, así que puede disminuir la presión sanguínea.

La sobredosis puede provocar sangrado por la nariz, vómitos, diarrea, confusión, problemas en el riñón.

La berberina puede alterar la manera en que algunos fármacos se metabolizan en el cuerpo. Por ejemplo, un estudio publicado en el European Journal of Pharmacology encontró que la berberina elevó la cantidad de ciclosporina A en pacientes con trasplante de riñón. [45]

2.2.10. Indicaciones terapéuticas:

Se prepara con 40 gramos de cortezas de raíces y tallos. Se toman tres tazas diarias antes de las comidas. [46]

2.3. MANAYUPA

Desmodium mollicum (HBK) D.C.

2.3.1. Taxonomia:

Familia : Leguminosa

Genero : Desmodium

Especie : mollicum (HBK) D.C.

2.3.2. Sinonimias:

No documentada.

2.3.3. Nombres populares:

Manayupa, runa manayupana, pata de perro, pega pega, allco pachaque, pie de perro [47, 48, 49,50], hierba del infante.

2.3.4. Descripción botánica:

Es una hierba rastrera que crece entre las rocas, posee flores rosadas a moradas [51]

2.3.5. Hábitat y distribución:

Es una especie endémica del Perú que crece entre los 3200-4000 msnm, común de los campos abiertos abonados, pastizales y también de las áreas de cultivo. [47] También se le encuentra en Bolivia y Ecuador [51].

2.3.6. Ubicación en el Perú:

En el Perú se le encuentra en Cuzco, se encuentra a 3300-3600 msnm y Apurimac 3200-3800 msnm. [51]

2.3.7. Bioagricultura:

Se propaga vegetativamente por estacas, pues la producción de semillas es baja y difícil de germinación. [48]

2.3.8. Usos medicinales:

Hojas y tallos: se utiliza por su propiedad diurética, antiinflamatoria, emenagogo, en el tratamiento de gastritis, afecciones renales [47, 48, 49,50], asma y casos de anafilaxia [48]; depurador sanguíneo, elimina las toxinas que han ingresado a nuestro organismo desde el exterior a través de alimentos o medicamentos, regula la digestión [52]. Se utiliza para tratamiento de heridas con pus, para hemorragias después del parto. [51]

Flor: antiinflamatorio de las vías urinarias y mucosas. [50]

2.3.9. Composición química:

Acido gálico, cinámico, almidón, aminoácidos, carotenoides, cumarinas, esteroides, fenoles, flavonoides, fructosa, glucosa, gomas, grasa, mucílago, resinas, riboflavina, taninos, tiamina, triterpenoides, vitamina E y K. [47,48]

2.3.10. Farmacobotánica y Farmacognosia:

La materia médica lo constituye toda la planta excepto la raíz. [51]

Los esteroides y ácidos orgánicos encontrados le confieren su efecto antiinflamatorio, también se ha observado su efecto en procesos de gastritis aguda y crónica, leve acción catártica.

Decocción: 3-4g de hojas y tallo hervir por 5 minutos en un litro de agua. [52]

4.3.11. Farmacología experimental:

Pre-clínica:

Avila y Conqui, en un estudio experimental "in vivo", en conejos, determinaron que el decocto de *Desmodium mollicum* a la dosis de 50mg/kg posee efecto antiinflamatorio significativo frente al grupo control y no significativo frente al patrón (Piroxican a la dosis de 0,3mg/kg) y a la dosis de 100mg/kg posee efecto antiinflamatorio muy altamente significativo frente al control y altamente significativo frente a Piroxicam y concluyeron que el decocto de *Desmodium mollicum* posee efecto antiinflamatorio. [47]

Rosas Lara, observaron que el extracto fluido y acuoso de *Desmodium mollicum*, en 15 conejos, a la dosis de 25mg/kg por vía oral, protegió significativamente a los animales sensibilizados impidiendo que produjeran las características propias del shock anafiláctico. [48]

Corcuera de los Santos (1996), a partir de su estudio realizado concluye que el decocto de *Desmodium mollicum* a la dosis de 100, 200 y 300mg/kg de p.c. produce efecto diurético, siendo mayor a la dosis de 200mg. El efecto producido por el decocto de *Desmodium mollicum* es semejante al producido por Furosemida a dosis pediátrica e inferior a dosis de adulto. [49]

2.3.12. Contraindicaciones y precauciones:

Se recomienda tomarla sola ya que puede tener efectos nocivos al ser mezclada con otra planta. [52]

2.3.13. Indicaciones terapéuticas:

Decocción. Tomar una tasa de 3-4 veces al día, por un periodo de 2-3 semanas. Como depurativo, fundamentalmente sobre el sistema renal; desinflamante de las vías urinarias y de mucosas del tracto gastrointestinal; para corregir el estreñimiento y como diurético. [52]

Extracto de la planta 350mg tres veces al día.

2.3.14. Toxicología:

No se encuentra efectos nocivos a las dosis habituales tradicionales (10-20g por litro).

Aunque son pocos los reportes de los trabajos clínicos, la planta suele producir en algunos pacientes rechazo por lo amargo de su sabor, en otros casos náuseas, dolo de cabeza, mareos etc.

2.4. CANCHALAGUA

Schukurhia pinnata var. octarristata

2.4.1 Taxonomia:

Familia : Compositae

Genero : Schukurhia

Especie : pinnata var. octarristata

2.4.2. Nombres populares:

Canchalagua [53].

2.4.3. Descripción botánica:

Planta anual que posee morfología y anatomía de las compuestas. Mide aproximadamente 30-40 cm. de altura, su tallo es longitudinalmente estirado, con hojas hasta el ápice. Presenta hojas alternas y sus flores son amarillas.

2.4.4. Hábitat y distribución:

Crece en zonas templadas, generalmente en terrenos ubicados entre 2500-5000 msnm. Habita en terrenos abiertos e invade los cultivos de la sierra del Perú considerándose una maleza secundaria. [53]

2.4.5. Ubicación en el Perú:

Crece en los valles andinos, entre los 2000-2700 msnm, en zonas templadas y calidas de la costa y sierra. Se cultiva en La Cantuta, Chosica (Lima). [54]

2.4.6. Bioagricultura:

Vegeta en verano, florece y fortifica en otoño. [53]

2.4.7. Usos medicinales:

Antiinflamatoria, depurativa; usada en enfermedades reumáticas, inflamaciones de la piel, alergia; también se usan en trastornos menstruales, menopausia, control de la fertilidad y tratamiento del acne. [55]

2.4.8. Composición química:

Almidón, antocianinas, carotenoides, compuestos reductores, cumarinas, esteroides, flavonoides, taninos, triterpenoides [53], resinas, glicósidos, sustancias grasas, sesquiterpenlactonas, sustancias fenólicas, acido oxálico, acido málico, azúcar (glucosa, fructosa, sacarosa), aminoácidos, proteínas, mucílagos. [56]

2.4.9. Farmacobotánica y Farmacognosia:

Los esteroides y flavonoides tienen marcada actividad antiinflamatoria.

Los flavonoides poseen acción similar a la cortisona, poseen también efecto antidiurético, contraceptivo y antibiótico.

NO SALE A DOMICILIO

Decocción: 10-20g de hojas y tallo en un litro de agua, hervir durante cinco minutos. [55]

Infusión: 10-20g de hojas y tallo en un litro de agua, hervir durante cinco minutos. [55]

2.4.10. Farmacología experimental

Pre-clínica:

Se realizó un estudio con el extracto acuoso de *S. pinnata* var octarristata a dosis de 300 mg/kg p.c. comparado con grupo control y patrón (dexametasona a dosis de 0,5mg) utilizando el método clásico en 12 conejos con inflamación inducida, verificando la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso. [53]

Atilano y Gonzáles determinaron que el infuso de hojas de *S. pinnata* presenta efecto diurético menor y semejante, a dosis de 25 y 50 mg de extracto seco por kilogramo de peso corporal, con respecto a hidroclorotiazida a dosis de 2 mg/kg p.c. en Rattus rattus var. Albinus, evidenciandose dicho efecto entre las 6 y 12 horas después de su administración. [56]

Univ. Nacional de la Amazonia Peruana
BIBLIOTECA CENTRAL
Iquitos - Perú
:00038

2.4.11. Indicaciones terapéuticas:

Decocción: tomar una taza 3 veces al día. [55]

Infusión: tomar una taza al día como depurador sanguíneo. [54]

2.5. HERCAMPURI

Gentianella alborosea (Ging) Fabris.

2.5.1. Taxonomia:

Familia : Gentanaceae

Genero : Gentianella

Especie : alborosea (Ging) Fabris

2.5.2. Sinonimias:

No documentada.

2.5.3. Nombres populares:

Hercampure, hircampure, hilcampure, té amargo, té de Chapín, harcapura, hir-campurek [57, 58,59], hjircan purek [60], té indio. [61]

2.5.4. Descripción botánica:

Planta de la familia de las Gentianaceas, es una planta anual o perenne [55], de 5cm 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 [57,59]; 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. [57]

2.5.5. Hábitat y distribución

Planta oriunda de los andes sudamericanos [62]. Se encuentra a la orilla de los lagos y en suelo húmedo. [61]

2.5.6. Ubicación en el Perú

Crece en la región Altoandina, entre los 2800 a 4300 msnm en las punas [61,59] de Puno, Huanuco, Junín, Ayacucho, Ancash, Amazonas, Cusco, Cerro de Pasco, Cajamarca. [57]

2.5.7. Bioagricultura:

La recolección debe ser en época de floración en los meses de mayo a julio. [57]

2.5.8. Usos medicinales:

Hojas y tallos: se usan por su propiedad colagoga, colerética, reguladora del metabolismo de las grasas, hipocolesterolémica, diurética, microbicida y fungicida [51, 60, 61,58], hipoglicemiante, várices [62], antiguamente, también se utilizaba para combatir la fiebre, posiblemente producida por el paludismo.

2.5.9. Composición química:

Contienen eritaurina, xantonas (formadas por ciclizacion de bezofenonas) como todas las gentianáceas, alcaloides, heterósidos [57,58,59], cumarinas, sustancias amargas de tipo glucosídico, sustancias antracénicas, azucares (gencianosa, gecibíosa y sacarosa), taninos, triterpenoides, leucoantocianidinas, catequizas [61,62], saponinas, resinas, ceras,

hemicelulosa, posible presencia de ácidos fenólicos, fitosterol y otros; contiene además: aluminio, calcio, magnesio, potasio, sodio, cloro [57] y también se reporta sesquiterpenos con un esqueleto denominado alborosin. [58]

2.5.10. Farmacobotánica y Farmacognosia

Cumarinas: además de sus propiedades dermatológicas, también son hipocolesterolémicas. [61]

El principio amargo de esta especie, en colagoga. [61]

Cocimiento: 20-30g hervir hojas y tallos por 5 minutos en un litro de agua. [57, 60,63]

Tintura: prepara al 20 % en alcohol de 60 grados. [57]

Extracto: 350 mg de la planta machacar y colar.

2.5.11. Farmacología experimental:

Pre-clínica:

Llanos Rebaza y Lamota Sánchez, en un estudio experimental "in vivo" con grupo testigo y patrón (colestipol) en conejos con hipercolesterolemia, demostraron que el decocto de *Gentianella alboroseae* a las dosis de 77mg y 134 mg/kg de p.c. ejerce efecto hipocolesterolemico y es de intensidad semejante a colestipol a la dosis de 286 mg/kg p.c., siendo el de menor dosis el que produce mayor efecto. Concluyeron que *Gentianella alboroseae* reduce los niveles de colesterol y LDL e incrementa ligeramente las HDL y VLDL. [61]

También se ha podido demostrar en ensayos biológicos sus acciones hipoglicemiante,

Cortijo y Rodríguez (Trujillo 1998), determinaron que el infuso de Gentianella alboroseae a dosis de 150 y 300 mg de extracto seco por kilogramo de peso, ejerce un efecto diurético semejante entre sí y a Hidroclorotiazida a dosis de 2 mg/kg p.c., pero es menor al producido por Furosemida a dosis de 10 mg/kg p.c. [64]

Clínica:

En la experiencia clínica se evidencia disminución del colesterol-LDL en sangre, movilizándolo 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. Demás es un regulador del metabolismo de las grasas, por lo que se utiliza par reducir la obesidad de tipo exógeno. [57]

Es también un gran regulador del metabolismo de las grasas, por ello se utiliza para reducir la obesidad de tipo exógeno.

2.5.12. Contraindicaciones y precauciones:

Si produce molestias digestivas tomarlo después de comidas. [60]

No deben tomar las gestantes ni personas muy delgadas. [63]

2.5.13. Indicaciones terapéuticas:

Cocimiento: tomar una taza 3 a 4 veces al día antes de las comidas, para favorecer la digestión de las grasas, disminuir el colesterol, como diurético débil [60,63] y como depurador sanguíneo, colagogo y afecciones hepáticas, diabetes y también como antiinfeccioso. [59]

Extracto: tomar tres veces al día.

Infusión: se utiliza para adelgazar [59].

2.5.14. Toxicología:

Aunque son pocos los reportes de los trabajos clínicos, la planta suele producir nauseas, dolos de cabeza y mareos.

2.6. FLOR DE ARENA

Tiquilia paranychioides

2.6.1. Taxonomia:

Familia : Boraginaceae

Genero : Tiquilia

Especie : Paranychioides

2.6.2. Sinonimias:

Yerba blanca, té indio [65].

2.6.3. Descripción botánica:

Hierba silvestre de la familia de las Boragináceas, de flores blanquecinas pequeñas. [66]

2.6.4. Hábitat y distribución:

Costa y sierra hasta los 1500 msnm. [65]

2.6.5. Ubicación en el Perú:

Andes del Perú. [67], Ica.

2.6.6. Usos medicinales:

Planta depurativa del sistema neuroglandular, de leve acción diurética y sedante. Elimina el exceso de acido úrico en la sangre, a menudo producido por el excesivo consumo de proteínas animales. También es útil en casos de artritis úrica y de intoxicación por alimentos. Se usa en enfermedad de gonorrea. [66]

2.6.7. Composición química:

Esteroides, flavonoides, taninos, saponinas, esteroidales, antocianinas, catequinas. [66]

2.6.8. Contraindicaciones y precauciones

Puede producir toxicidad por encima de los 10gr. presentándose diarrea, nauseas. [66]

2.6.9. Indicaciones terapéuticas

Hervir 1L de agua; luego de hervir, verter una cucharadita al ras y dejar sedimentar de 5 a 10 minutos. Colar y bebe el litro completamente dividiéndolo en 3-4 diferente dosis durante el día. [66].

2.7. 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. [67]

En los organismos superiores, la información hereditaria está organizada en cromosomas. Los cromosomas son unas hebras muy condensadas de ADN asociado a proteínas. Dentro de cada cromosoma, cada molécula de ADN está configurada como un par de largas cadenas no ramificadas de subunidades de nucleótidos unidas por enlaces fosfodiéster que unen el carbono 5 de una unidad desoxirribosa al carbono 3 de la siguiente. Además, una de las cuatro bases de nucleótidos diferentes (adenina, citosina, guanina o timina) está unida a cada subunidad de desoxirribosa como las cuentas de un collar. En el sentido

tridimensional, cada par de hebras de ADN forma una doble hélice en la que todas las bases están orientadas hacia el interior de la espiral. Dentro de la hélice, cada base de una hebra está asociada a su base complementaria de la otra hebra; el enlace hidrógeno impone un apareamiento fuerte y no covalente de la adenina con la timina y de la guanina con la citosina. Como la secuencia de bases de nucleótidos es complementaria a todo lo largo de la doble molécula de ADN, ambas hebras llevan esencialmente la misma información genética.

De hecho, durante la replicación del ADN cada hebra sirve como molde para la producción de otra hebra nueva y equivalente.

Utilizando el ARN y una serie de proteínas, la célula acaba por descifrar la información codificada por la secuencia lineal de bases dentro de regiones específicas del ADN (genes) y produce proteínas que son esenciales para su supervivencia básica y para el crecimiento y diferenciación normales. En esencia, los nucleótidos funcionan como un alfabeto biológico que se utiliza para codificar la producción de aminoácidos, que son los componentes básicos de las proteínas. [67]

Cuando se insertan nucleótidos incorrectos o se pierden nucleótidos, o cuando se añaden nucleótidos innecesarios durante la síntesis del ADN, el error se denomina mutación. Se ha estimado que se produce menos de una mutación por cada 109 nucleótidos que se incorporan durante la replicación celular normal. Aunque las mutaciones no son necesariamente nocivas, las alteraciones que provocan una desactivación o una expresión excesiva de genes importantes pueden desembocar en diversos trastornos, como el cáncer, enfermedades hereditarias, anomalías del desarrollo, esterilidad y muerte embrionaria o perinatal.

En muy raras ocasiones una mutación puede incrementar las posibilidades de supervivencia; esos casos son la base de la selección natural.

Aunque algunas sustancias químicas reaccionan directamente con el ADN, en la mayoría de ellas se precisa una activación metabólica. En estos casos, son productos intermedios electrófilos, como los epóxidos o iones carbonio, los que en última instancia inducen las lesiones en diversos lugares nucleófilos del material genético. En otros casos, la genotoxicidad está mediada por productos secundarios de la interacción del compuesto con lípidos, proteínas u oxígeno intracelulares. [67]

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. [67]

Es característico que los compuestos que contienen una sola unidad electrófila causen la genotoxicidad produciendo monoaductos 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.[67]

Tabla N°01: Ejemplos de sustancias químicas que muestran genotoxicidad en células humanas

Clase de sustancias	**Ejemplo**	**Fuente de la exposición**	**Lesión genotóxica probable**
Aflatoxinas	Aflatoxina B1	Alimentos contaminados	Aductos de ADN abultados
Aminas aromáticas	2-Acetilaminoflureno	Ambiental	Aductos de ADN abultados
Aziridina quinonas	Mitomicina C	Quimioterapia para cáncer	Monoaductos, entrecruzamientos interhebras y roturas monohebra en el ADN.
Hidrocarburos clorados	Cloruro de vinilo	Ambiental	Monoaductos en el ADN
Metales y compuestos metálicos	Cisplatina Compuestos del níquel	Quimioterapia por cáncer Ambiental	Entrecruzamientos intra e interhebras en el ADN. Monoaductos y roturas monohebra en el ADN.
Mostazas nitrogenadas	Ciclofosfamida	Quimioterapia por cáncer	Monoaductos y entrecruzamientos interhebras en el ADN.
Nitrosaminas	*N*-Nitrosodimetilamina	Alimentos contaminados	Monoaductos en el ADN
Hidrocarburos aromáticos policiclicos	Benzo(a)pireno	Ambiental	Aductos de ADN abultados

Los estudios clínicos han demostrado que las personas con defectos heredados en su capacidad de reparar el ADN dañado suelen desarrollar cáncer y/o anomalías de desarrollo a una edad temprana. Esos ejemplos proporcionan sólidos argumentos en el sentido de que la acumulación de daños al ADN está relacionada con la enfermedad humana. Análogamente, agentes que promueven la proliferación celular (como el acetato de tetradecanoilforbol) incrementan con frecuencia la

carcinogénesis. En el caso de esos compuestos, la mayor probabilidad de transformación neoplásica puede ser una consecuencia directa del menor tiempo de que dispone la célula para llevar a cabo la adecuada reparación del ADN.

Las primeras teorías sobre la forma en que las sustancias químicas interactúan con el ADN se remontan a los estudios que se realizaron durante el desarrollo del gas mostaza con fines bélicos. Se amplió después el conocimiento de estos procesos cuando se trató de identificar agentes anticarcinógenos que detuvieran selectivamente la replicación de células tumorales en rápida división. La mayor preocupación de la opinión pública por los peligros ambientales ha impulsado nuevas investigaciones sobre los mecanismos y consecuencias de la interacción de sustancias químicas y material genético. En la Tabla 01 figuran ejemplos de diversos tipos de sustancias químicas que causan genotoxicidad. [67]

2.8. ESPERMATOGÉNESIS

En los mamíferos, la espermatogénesis es un proceso altamente complejo de división y diferenciación celular, por medio del cual las células germinales indiferenciadas se transforman en espermatozoides, la producción de espermatozoides tiene lugar en los testículos, dentro de los túbulos seminíferos, e implica proliferación celular por medio de divisiones mitóticas, duplicación de cromosomas, recombinación y división meiótica para producir espermátides haploides y, finalmente, diferenciación de las espermátides en espermatozoides. Así, la espermatogénesis puede dividirse entre fases: proliferativa o mitótica, de reducción o meiótica y de diferenciación o espermiogénesis. Estas tres fases están asociadas con determinados tipos de células germinales: espermatogonia,

espermatocitos y espermátides respectivamente. La espermatogénesis está regulada por vía endocrina. Este proceso depende del estímulo de la hormona folículoestimulante (FSH) de la hipófisis anterior, que actúa sobre la línea germinativa, y de la hormona luteinizante (LH), que estimula la secreción de testosterona por parte de las células intersticiales. La testosterona, además de otros efectos, estimula la espermatogénesis. La FSH actúa sobre las células de Sertoli, estimulándolas a producir la proteína ABP (androgen binding protein), que se une a la testosterona y aumenta la concentración de ésta en el túbulo seminífero. (68,69,70,71)

En el ratón, la espermatogénesis empieza poco después del nacimiento. Durante el periodo prepubertal, el epitelio de los túbulos seminíferos muestran sólo células de Sertoli y espermatogonia; el último da lugar a los espermatocitos primario, mientras entra así en la primera profase meiótica. A los 22-24 días, las primeras espermátides aparecen y alrededor del día 28. (72,73)

2.8.1. Fases de la Espermatogénesis

Fase Proliferativa o Mitótica, las espermatogonias están presentes en el compartimento basal del epitelio de los túbulos seminíferos y están separadas de otras células germinales en desarrollo por las uniones estrechas entre las células de Sertoli, cuya función principal es crear un medio ambiente favorable para la diferenciación celular, ya que permite que estén es estrecho contacto y bloquean la penetración de sustancias potencialmente lesivas formando la barrera hemato- testicular. Durante la fase proliferativa de la espermatogénesis, algunas de estas espermatogonias se dividen mitóticamente para producir espermatogonias

diploides y espermatogonias que sufren otra división mitótica para producir espermatocitos primarios o de primer orden. [71, 74, 75,76]

Fase de Reducción o Meiótica, proceso reduccional del número de cromosoma que consiste en dos divisiones celulares, habiendo la síntesis de ADN solamente antes de la primera división meiótica, el espermatocito primario son las células de mayor volumen de la línea espermatogénica contienen 46 cromosomas pero doble cantidad de ADN. Como la profase de esta división es muy lenta, pasando por las fases de leptoteno, cigoteno, paquiteno y diploteno. De esta primera división meiótica resultan células menores, llamadas espermatocitos secundarios o de segundo orden, los cuales poseen 23 cromosomas cada uno y no replican ADN e inician de inmediato la segunda división meiótica para formar las espermátides, con 23 cromosomas y solamente la mitad del ADN. [77,78,71,76]

Fase de Diferenciación o Espermiogénesis, es el proceso, durante el cual las espermátides sufren citodiferenciación que no comprende divisiones celulares; es decir, cambian desde una simple célula a un espermatozoide maduro (esperma), altamente diferenciado después de sufrir complejos cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos.

Este proceso dura aproximadamente 22 días en humanos. [69, 79, 78, 71,76]

2.8.2. Estructura del Espermatozoide

El espermatozoide posee una cabeza que está formada por el núcleo celular condensado, revestido de una fina capa de citoplasma y de membrana celular en torno a su superficie. En la porción anterior del núcleo existe una capa gruesa denominada *acrosoma*, consistente sobre todo en el aparato de Golgi. Éste contiene cierto número de enzimas similares a las que se encuentran en los lisosomas de las células típicas, incluida la *hialuronidasa* y poderosas *enzimas proteolíticas*. Estas enzimas desempeñan funciones importantes, pues permitan al espermatozoide entrar en el ovulo y fecundarlo.

La cola del espermatozoide, denominada *flagelo*, tiene tres componentes principales: 1). Un esqueleto central constituido por 11 microtúbulos, denominadas en conjunto *axonema*, 2). Una fina membrana celular que reviste el axonema y 3). Una serie de mitocondrias que rodean el axonema de la porción proximal de la cola. [79, 76,78,] (Ver anexo 01)

2.8.3. Alteraciones Morfológicas del Espermatozoide del ratón

Existen espermatozoides anormales del ratón, tales como amorfo, sin gancho y banana; [27] esto se debe a una serie de factores hormonales, no hormonales y externos, como:

La temperatura es muy importante en la regulación de la espermatogénesis, que solamente tiene lugar con temperaturas por debajo de los 37°C del cuerpo.

La "criptorquidia" (falta de descenso de uno o ambos testículos desde el abdomen al escroto en el periodo perinatal), los testículos se mantienen a

una temperatura alta pudiendo impedir la espermatogénesis y por ende la degeneración de la mayor parte de las células de los túbulos seminíferos además de las espermatogonias, incapaces de formar espermatozoides.

La desnutrición, el alcoholismo y la acción de drogas son otros factores que afecta la espermatogénesis, apareciendo alteraciones en la línea espermatogenética, con una producción desminuida de espermatozoides. Los rayos x también provocan alteraciones en las espermatogonias. [78,76]

2.9. ENSAYO DE LA MORFOLOGÍA DE LA CABEZA DEL ESPERMATOZOIDE DEL RATÓN.

Los efectos adversos de la mutagénesis en la salud pueden manifestarse por la transmisión del daño inducido en células germinales a las futuras generaciones, trastornos que pueden expresarse desde la fertilización hasta la etapa adulta, afectando la capacidad reproductiva de los seres humanos e incrementando la carga de enfermedades genéticas dentro de la población. Además sustancias mutágenas pueden afectar también a la función reproductora dañando la integridad de las células germinales. [74]

De ocurrir cambios en las células germinales de los organismos, se pueden originar mutaciones en la descendencia más cercana o puede transcurrir un tiempo prolongado entre la exposición al compuesto genotóxico y la manifestación del daño provocado.[15] Todo esto hace indispensable la evolución toxicológica preclínica, y dentro de ella, el estudio genotóxico de todos aquellos nuevos compuestos que se pretenden introducir en el organismo humano.

Las preparaciones de origen vegetal constituyen mezclas muy complejas de diversas sustancias en las que es usual encontrar componentes con propiedades antimutagénicas como la clorofila y los carotenoides, los cuales podrían debilitar el posible efecto genotóxico presentes en la misma mixtura. [75]

Con este objetivo se han desarrollado diversos sistemas de ensayo, que utilizan desde bacterias hasta mamíferos, e incluso cultivos de células humanas, los cuales se realizan a corto plazo; estos son económicos, fáciles de ejecutar, reproducibles y producen resultados en un corto período de tiempo, permitiendo obtener una evaluación rápida del potencial mutagénico de un compuesto dado. Dentro de estos ensayos a corto plazo se encuentran el ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide del ratón.

El método descrito originalmente por Wyrobek y Bruce (1975) [27] ha sido modificado para detectar daño en células germinales, que consiste en cuantificar poblaciones de espermatozoides anormales; los agentes físicos o químicos capaces de incrementar esta población, serían igualmente capaces de interferir en el proceso de diferenciación de células germinales, ya que a la vez el sistema refleja efectos de interferencia con un proceso de diferenciación celular "*in vivo*". [26]

2.10. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA CICLOFOSFAMIDA.

Agente alquilante

Los agentes alquilantes funcionan por medio de tres mecanismos diferentes, los cuales todos alcanzan el mismo resultado - la interrupción de la función del ADN y la muerte celular.

En el primer mecanismo un agente alquilante (representado en la figura A2 debajo como una estrella rosada) adhiere grupos alquilos (compuestos pequeños de carbono-ilustrados como triángulos rosados) a las bases del ADN. Esta alteración resulta en que el ADN sea fragmentado por las enzimas de reparo cuando éstas tratan de reemplazar las bases alquiladas. Las bases alquiladas previenen la síntesis del ADN y la transcripción del ARN del ADN afectado. [76]

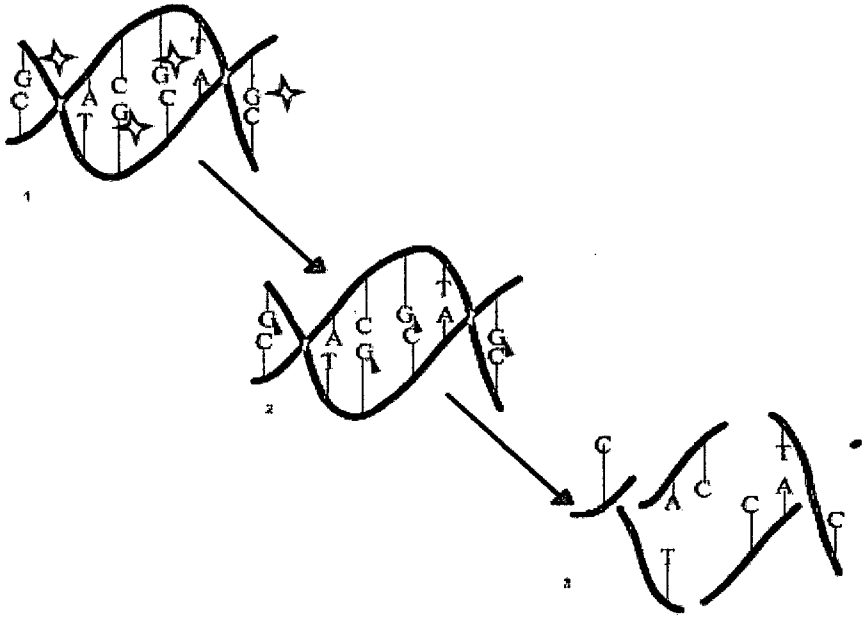


Figura A. Primer mecanismo

Un segundo mecanismo por el cual los agentes alquilantes causan daño al ADN es en la formación de puentes cruzados, uniones entre átomos en el ADN (las cadenas rosadas debajo figura B3). En este proceso, dos bases son unidas por

medio de un agente alquilante que tiene dos sitios de unión con el ADN. Los puentes pueden ser formados dentro de una sola molécula de ADN (como es ilustrado debajo) o como puentes cruzados que conectan dos moléculas distintas de ADN. Este enlace previene el ADN de ser separado para la síntesis o la transcripción. [76]

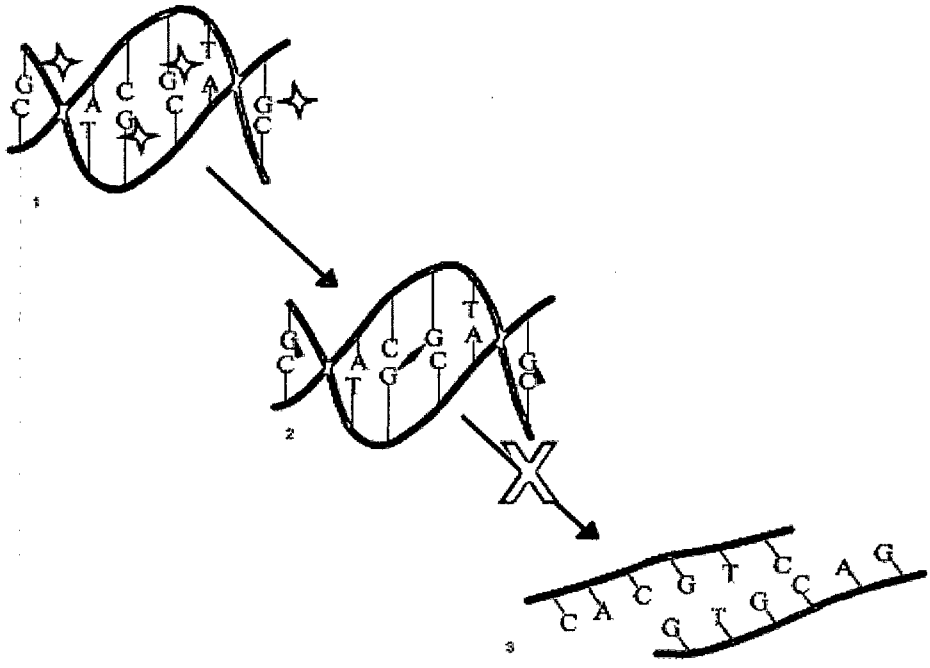


Figura B. Segundo mecanismo

Un tercer mecanismo de acción de los agentes alquilantes es la inducción de nucleótidos disparejos llevando a mutaciones (debajo Figura C3). En una doble hélice normal de ADN, A siempre se empareja con la T y G siempre se empareja con C. Como la figura muestra, las bases alquiladas G pueden ser emparejadas erróneamente con T. Si esta alteración sucede y no es corregida, esto puede resultar en una mutación permanente. [76]

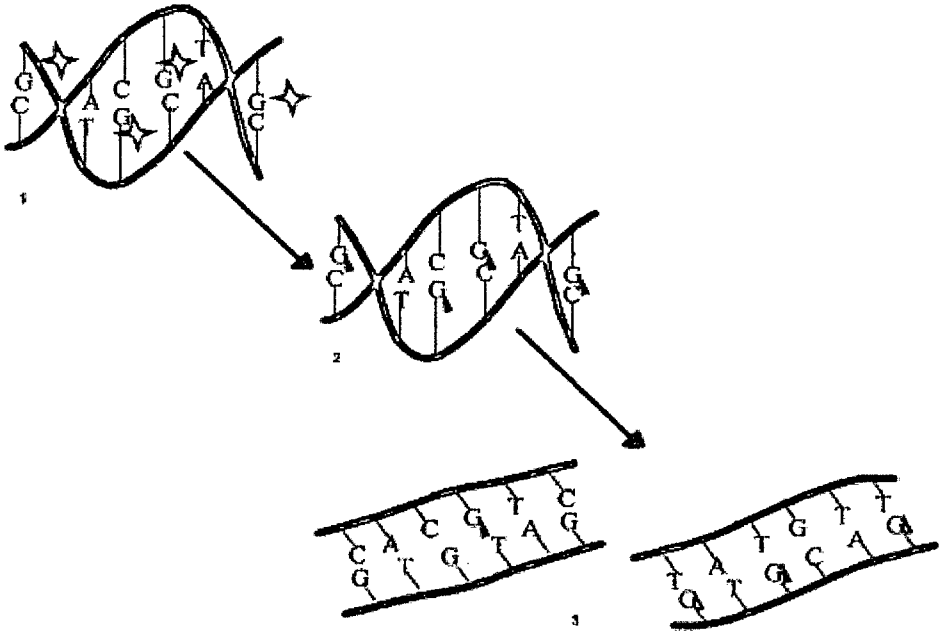


Figura C. Tercer mecanismo

USOS: Sirven para tratar la enfermedad de Hodgkin, linfomas, leucemias crónicas y algunos carcinomas de pulmón, mama, próstata y ovario. Los agentes alquilantes se administran oral o intravenosa. Ejemplos de fármacos de esta categoría son: ciclofosfamida, mecloretamina y cisplatino (Platinol). [76]

Efectos secundarios:

- Teratogénico
- Mutagénico
- Carcinogénico
- Mielo supresión
- Necrosis tisular en el área de administración
- Estomatitis de boca, ojos y ano.

2.11. HIPÓTESIS

El extracto acuoso liofilizado de *Berberis vulgaris L* (Hojas); *Desmodium molliculum* (Hojas y tallos); *Gentianella alborosea* (Planta entera); *Schukurhia pinnata* var. Octarristata (Tallos y hojas); y la *Tiquilia paranychioides* (Flores), es probable que no posean acción genotóxica a la dosis de 1600 mg/Kg de peso corporal, cuando se administra a los Ratones Albinos *Mus musculus* cepa Balb/C CNPB.

2.12. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA	TIPO DE VARIABLE
– Peso de los animales.	Peso de los animales por cada grupo experimental.	Determinación del peso vació individual mediante la balanza digital de los grupos experimentales.	Peso en gramos (g)	Nominal	Cuantitativo
– Peso de los testículos y epidídimos aislados de los Ratones Albinos.	Peso de los testículos y epidídimos aislados de los animales por cada grupo experimental.	Aislamiento de los testículos, epidídimos y pesaje mediante la balanza analítica por cada grupo experimental.	Peso en gramos (g)	Nominal	Cuantitativo
– Morfología de la cabeza de los espermatozoides del ratón.	Identificación de la morfología de los espermatozoides: banana, amorfos, sin gancho y normal de los grupos experimentales animales que recibieron las sustancias en ensayo.	Corte y trituración del epidídimo formando una suspensión para ser fijada y coloreada, posteriormente se realizará un extendido y conteo de láminas.	Recuento de las formas de espermatozoide mediante el uso del microscopio.	Nominal	Cualitativo

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA	TIPO DE VARIABLE
Dosis del extracto acuoso liofilizado de *Berberis vulgaris L* (Hojas); *Desmodium molliculum* (Hojas y tallos); *Gentianella alborosea* (Planta entera); *Schukurhia pinnata* var. Octarristata (Tallos y hojas); y la *Tiquilia paranychioides* (Flores).	Producto seco de la extracción acuosa de las especies vegetales en estudio.	Extracción acuosa por cocción, filtrado, congelado y liofilizado (- 40° C, $1.33x10^{-3}$ MBARR/72horas).	Dosis de 1600 mg/Kg. de peso corporal para cada extracto.	Nominal	Cualitativo

CAPITULO III

3.1. METODOLOGÍA

3.1. Tipo de investigación

Experimental: Porque se realizará el control meticuloso de determinadas Variables. Siguiendo un plan previo (protocolo de estudio), con el fin de investigar las posibles relaciones causa efecto.

Descriptivo: Porque el estudio describirá e interpretará en forma detallada los hechos obtenidos en la investigación

Prospectivo: En el registro de la información se tomarán en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio.

Longitudinal: Se estudiarán las variables a lo largo del tiempo durante el período de investigación.

3.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.

3.2.1. Evaluación de la Genotoxicidad

Ensayo preclínico, con grupos tratados al azar, bajo condiciones controladas.

Se formaron 7 grupos experimentales, cada grupo del sexo macho de 7 animales cada uno, para cada dosis evaluada, que fueron administrados por 5 días consecutivos a intervalos de 24 horas.

La distribución de los grupos de estudio será según el siguiente esquema de tratamiento:

Grupos Experimentales: Extracto acuoso liofilizado de *Berberis vulgaris L* (Hojas); *Desmodium molliculum* (Hojas y tallos); *Gentianella alborosea* (Planta entera); *Schukurhia pinnata* var. Octarristata (Tallos y hojas); y *Tiquilia paranychioides* (Flores), a dosis de 1600 mg/kg/p.c.-Vía oral.

Grupo Control Negativo: Solución salina al 0.9%-Vía oral.

Grupo Control Positivo: Ciclofosfamida USP 40 mg/kg/p.c.-Vía intraperitoneal.

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.3.1. Población vegetal

Conjunto de Hojas de *Berberis vulgaris L*; hojas y tallos de *Desmodium molliculum*; tallos y hojas de *Schukurhia pinnata* var. Octarristata; planta entera de *Gentianella alborosea*; y las Flores de *Tiquilia paranychioides*; provenientes de los departamentos Cusco, Apurimac, Junín, Lima (Chosica), e Ica respectivamente.

3.3.1.1. Muestra vegetal

La muestra vegetal estuvo constituida por 300 gramos de hojas desecadas de *Berberis vulgaris L*; 300 gramos hojas y tallos *Desmodium molliculum*; 300 gramos de tallos y hojas de *Schukurhia pinnata;* 300 gramos de planta entera de *Gentianella alborosea* var. Octarristata; y 300 gramos de las Flores de *Tiquilia paranychioides*. La selección de la muestra vegetal fue al azar teniendo en cuenta los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

Muestras aparentemente sanas y en buen estado.

3.3.2. Población animal

El estudio experimental se realizó en ratones *Mus musculus* cepa Balb-CNPB, sexo macho del Centro Nacional de Producción de Biológicos del Instituto Nacional de Salud (INS), con sede en la ciudad de Lima.

3.3.2.1. Muestra animal

70 ratones albinos *Mus musculus*, teniendo en consideración que en toda investigación se tiene una perdida de hasta el 20% del tamaño muestral. La selección de los animales se realizó al azar teniendo en cuenta los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

- Ratones machos jóvenes y sanos.
- Ratones con peso corporal de 24± 3 gr.
- Ratones no manipulados experimentalmente.

3.4. PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.4.1. Recolección de la Muestra Vegetal

En primer lugar se ubicaron los lugares de los cuales se recolectó la especie *Berberis vulgaris L* (Agracejo), *Desmodium molliculum* (Manayupa), *Schukurhia pinnata* var. Octarristata (Canchalagua), *Gentianella alborosea* (Hercampuri), *Tiquilia paranychioides* (Flor de Arena), provenientes de los departamentos Cusco, Apurimac, Lima (Chosica), Junín e Ica respectivamente. Con el apoyo del Herbarium Amazonense y el Ing. Agrónomo Jorge Isaac Villacrés Vallejo se adquirió las muestras en estudio a partir de la cual se procedió a obtener el liofilizado, para luego evaluar los posibles efectos tóxicos mediante el ensayos de anomalías en la cabeza de espermatozoide de ratón, para obtener la recolección de los datos que se basaron en el recuento de los espermatozoides mediante la observación microscópica.

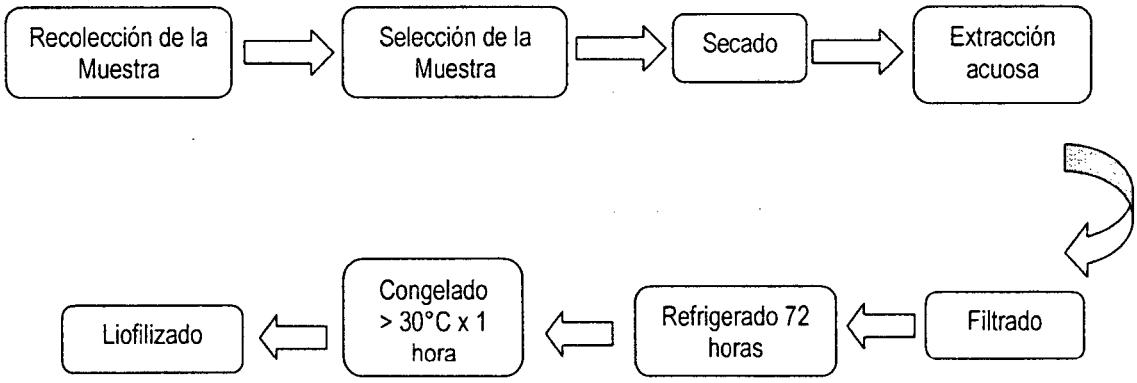
3.4.2. Identificación taxonómica de la muestra vegetal.

Las exicatas debidamente separadas durante la adquisición de la muestra fueron llevadas al Herbarium Amazonense (AMAZ) de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana de la UNAP para su identificación taxonómica. (Anexo 05).

3.4.3. Obtención del Extracto Acuoso Liofilizado

Los extractos liofilizados de las cinco especies, se obtuvo a partir de las partes de la planta, extraído en el Laboratorio de Fitoquímica del IMET-ESSALUD de la ciudad de Iquitos.

Flujograma del Procedimiento de Extracción



Congelación del extracto acuoso: El extracto acuoso fue congelado a (-30° C), por 1 hora previo a la liofilización.

Liofilización del extracto acuoso: Consiste en eliminar el agua del extracto acuoso congelado a temperatura y presión de vapor bajo mediante sublimación

Luego el extracto liofilizado fue pesado, envasado y rotulado, enseguida almacenado en ambiente seco a temperatura menor de 25°C en frascos con cierre hermético y alejado de la luz.

3.4.4. Preparación del Extracto Liofilizado para ser administrado a los Ratones.

Para la administración del extracto se determinó el factor de volumen (0.016ml x 10-2/ gr.p.c.) y la concentración de acuerdo la dosis a evaluar que es de 1600 mg/kg/p.c., haciendo uso de la tabla de dosificación (Ver anexo Nº 02).

Luego se determinó el peso corporal promedio de los ratones según grupos experimentales y se procedió a calcular la dosis haciendo uso de las siguientes fórmulas:

- **Volumen de la solución preparada del extracto liofilizado para administrar a cada ratón.**

$$\boxed{\textbf{V.I. (ml) = W ratón (gr.) x FV}}$$

Leyenda:

VI = Volumen inoculo administrado
W ratón = Peso del ratón
FV = Factor de volumen

V.I. (ml) = 23.0 gr. x 0.016 ml/gr

V.I. (ml) = 0.368 ml.

- **Volumen requerido del solvente (Solución salina 0.9%)**

$$\boxed{\text{VS (ml)} = \text{WP ratón (gr.)} \times \text{FV} \times \text{NI}}$$

Leyenda:

VS = Volumen del solvente
WP ratón = Peso promedio de los ratones
FV = Factor de volumen
NI = Número de individuos

VS (ml) = WP ratón (gr.) x FV x NI
VS (ml) = 22.38 gr. x 0.016 ml/gr x 8

VS (ml) = 2.865 ml

- **Formula de la Cantidad requerida del extracto liofilizado**

$$\boxed{\text{ExL (gr.)} = \frac{[\,]\text{gr.} \times \text{VS (ml)}}{100\text{ml}}}$$

Leyenda:

ExL = Extracto liofilizado
VS = Volumen del solvente
[ ]gr = Concentración

$$\text{ExL (gr.)} = \frac{10\text{ gr.} \times 4\text{ ml}}{100\text{ ml}}$$

ExL (gr.) = 0.4 gr.

3.4.5. Preparación del Control Negativo (Solución salina 0.9%)

- **Volumen de la solución salina para administrar a cada ratón**

V.I. (ml) = W ratón (gr.) x FV

Leyenda:

VI = Volumen inoculo administrado
W ratón = Peso del ratón
FV = Factor de volumen

V.I. (ml) = 21.3 gr. x 0.02 ml/gr

V.I. (ml) = 0.426 ml.

- **Volumen requerido de Solución salina 0.9%**

VS (ml) = WP ratón (gr.) x FV x NI

Leyenda:

VS = Volumen del solvente
WP ratón = Peso promedio de los ratones
FV = Factor de volumen
NI = Número de individuos

VS (ml) = WP ratón (gr.) x FV x NI

VS (ml) = 22.36 gr. x 0.02 ml/gr x 8

VS (ml) = 3.578 ml

3.4.6. Preparación del Control Positivo (Ciclofosfamida)

- **Volumen de la solución preparada de la Ciclofosfamida para administrar a cada ratón.**

V.I. (ml) = W ratón (gr.) x FV

Leyenda:

VI = Volumen inoculo administrado
W ratón = Peso del ratón
FV = Factor de volumen

V.I. (ml) = 23.8 **gr. x** 0.02 **ml/gr**

V.I. (ml) = 0.476 ml

- **Volumen requerido del solvente (Solución salina 0.9%)**

VS (ml) = WP ratón (gr.) x FV x NI

Leyenda:

VS = Volumen del solvente
WP ratón = Peso promedio de los ratones
FV = Factor de volumen
NI = Número de individuos

VS (ml) = WP ratón (gr.) x FV x NI

VS (ml) = 23.33 gr. x 0.02 ml/gr x 8

VS (ml) = 3.7328 ml

❖ **Formula de la Cantidad requerida de Ciclofosfamida**

$$C\ (gr.) = \frac{[\ ]gr.\ \times\ VS\ (ml)}{100ml}$$

Leyenda:

C = Ciclofosfamida en gramos
VS = Volumen del solvente
[ ]gr = Concentración

$$C\ (gr.) = \frac{0.2\ gr.\ \times\ 4\ ml}{100\ ml}$$

C (gr.) =0.008 gr.

0.008 gr. de Ciclofosfamida x 5 días = **0.04 gr.**
disuelto en **20 ml** de ClNa 0.9%

3.4.7. Ensayo de Anomalías en la Cabeza del Espermatozoide del Ratón [26, 27] (Ver Anexo Nº 03)

Etapa de cuarentena y sistema de identificación de los animales de experimentación

Los animales estuvieron sometidos a cuarentena durante una semana (7 días), con la finalidad de que los animales se adapten a su entorno ambiental y durante este período estuvieron bajo observación permanente.

Formación de grupos experimentales

Se estableció 7 grupos experimentales de 7 ratones cada uno; por cada extracto vegetal a evaluar se formo un grupo y se procedió de la siguiente manera:

Grupos experimentales	Concentración (%)	Dosis (mg / kg / pc)
Grupo I: *Berberis vulgaris L*	10	1600
Grupo II: *Desmodium mollicum*	10	1600
Grupo III: *Schukurhia pinnata*	10	1600
Grupo IV: *Gentianella alborosea*	10	1600
Grupo V : *Tiquilia paranychioides*	10	1600
Grupo VI : Control positivo	-	40
Grupo VII : Control negativo	0.9	-

Pesado y Marcaje / Identificación para registro

Para obtener el peso de los animales se utilizo una balanza digital, luego se procedió a marcarlos e identificarlos en forma inequívoca (marcas), ayudados con un hisopo embebido en solución de Picrato de Sodio.

Se utilizaron un total de 49 animales machos (7 animales por cada grupo experimental), teniendo en cuenta la edad (6-8 semanas) tiempo en que se inicia la madurez sexual.

Administración de las Sustancias

Se administraron los extractos acuosos liofilizados de las 5 especies vegetales (1600mg/kg/pc) y solución salina (0.9%) por vía oral por ser la propuesta para el uso en humanos, y la Ciclofosfamida (40 mg/kg/pc) por vía intraperitoneal, fueron realizadas durante cinco días consecutivos a intervalos de 24 horas en las primeras horas de la mañana.

Sacrificio de los animales

Después de 35 días de la primera administración, se volvió a pesar los animales, para proceder con el sacrificio de estos por dislocación cervical, considerando los principios éticos de experimentación en animales. Luego se utilizo con una pinza estéril y algodones embebidos en alcohol al 70%, se procedió a desinfectar la parte inferior del abdomen, se corto la piel con ayuda de tijeras y pinzas dejando al descubierto el sistema reproductor del animal; seguidamente se extrajo los testículos y epidídimos que se colocaron en placas petri; paralelo a esto se pesaron los mismos en una balanza analítica separando la porción distal de ambos.

Preparación de la solución espermática

A cada una de las placas conteniendo los epidídimos (previamente codificados), se añadió 3ml de Solución salina al 0.9% y con ayuda de tijeras se procedió a cortarlos hasta triturarlos y obtener una suspensión blanquecina.

Tinción de la solución espermática

Las suspensiones de espermatozoides fueron transferidas a tubos cónicos, previamente codificadas, coloreadas con 300 µl de eosina al 1% dejándolos reposar por 5 min.

Extensión de las láminas

Se coloco 10 µl de la solución espermática en láminas portaobjetos, codificadas aleatoriamente; y fueron extendidas con ayuda de laminillas. Cada animal contará con 2 láminas.

Observación Microscópica y Lectura de láminas

La evaluación de las láminas codificadas, se realizó utilizando un microscopio binocular OLYMPUS, con aumento de 400x. Se procedió a contar al menos 1000 espermatozoides por animal (500 x lámina) y se clasifico siguiendo el criterio de Wyrobek y Bruce, basado en cabezas normales, amorfas, bananas y sin gancho. [26, 27] (Ver Anexo Nº 04)

3.5. INSTRUMENTOS

3.5.1. Material vegetal.

Extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Berberis vulgaris L*; hojas y tallos de *Desmodium molliculum*; tallos y hojas de *Schukurhia pinnata* var. Octarristata; planta entera de *Gentianella alborosea* y las Flores de *Tiquilia paranychioides.*

3.5.2. Material animal

Ratones albinos machos cepa Balb/c-CNPB, provenientes del Centro Nacional de Producción de Biológicos - Instituto Nacional de Salud (INS) con sede en la ciudad de Lima.

3.5.3. Materiales de vidrio

- Láminas porta objetos
- Placas petri
- Tubos de ensayo 13x100 mm.
- Tubos cónicos de centrífuga de 10 ml – 15 ml
- Varilla de vidrio.
- Vaso de precipitado x 100 ml.

3.5.4. Material plástico y metal.

- Algodón
- Bandejas plásticas
- Cánula intragástrica Nº 17

- Cartulina
- Equipo de disección
- Espátula de acero
- Guantes descartables Nº 7
- Gradilla porta tubos x 48
- Mascarillas descartables
- Micropipeta de 10 – 100 uL.
- Papel despacho
- Papel toalla
- Parafilm
- Plumón marcador indeleble
- Tips descartables de 100 y 1000 uL.

3.5.5. Reactivos

- Alcohol al 70%
- Ciclofosfamida 40 mg / Kg.
- Eosina al 1%
- Picrato de sodio
- Solución salina al 0.9%
- Tripsina 1 %

3.5.6. Equipos

- Balanza analítica METTLER TOLEDO AG 204
- Balanza digital
- Contador manual de células
- Liofilizador: Freezer Dry sisten/Freezone 4,5 L LABCONCO
- Microscopio binocular OLYMPUS
- Refrigeradora FRIO LUX

3.5.7. Materiales de bioseguridad

- Mandil
- Mascarilla
- Guantes

3.6. ANÁLISIS DE DATOS

Las comparaciones individuales entre los grupos evaluados con los extractos vegetales y grupos controles, se realizó a través de promedios y desviaciones estándar, además del análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía, con nivel de significancia del 95% ($p<0.05$); auxiliado por el programa SPSS ver15 para Windows. El criterio de genotoxicidad fue el incremento significativo de porcentaje de espermatozoides con cabezas anormales del ratón.

3.7. PROTECCIÓN DE LOS DERECHOS DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Ética y cuidado de los animales utilizados en investigación

En toda experimentación en la que se manipule debe aplicarse la Regla de 3 R: "Reducción, Refinamiento, Reemplazo" (Reduce, Refine, Remplace).

1) Reducción: utilizar el número mínimo imprescindible de animales. De este modo se evitaran las repeticiones de los estudios (protocolos de ensayo bien definidos y estudios previos, bibliografía, etc.).

2) Refinamiento: mejorar las pruebas experimentales y las condiciones de vida de los animales para prevenir todo tipo de sufrimiento inútil, aprovechando las informaciones obtenidas en un solo experimento.

3) Reemplazo: remplazar cuando sea posible los ensayos sobre animales por métodos alternativos.

Por lo tanto, todo experimentador tiene el deber de preguntarse:

1) Si está capacitado (o si la estructura donde trabaja tiene personal capacitado) para el manejo de los animales y de las técnicas invasivas.
2) Si la estructura donde trabaja tiene los requisitos para alojar o criar animales en condiciones reconocidas por la comunidad científica internacional y el legislador.

3) Si los animales provienen de estructuras de producción legalmente establecidas.
4) Si los experimentos planificados son científicamente válidos y si no son la repetición de experimentos ya publicados.
5) Si la manipulación se realiza en condiciones que garanticen el mínimo de sufrimiento tanto a nivel físico como psicológico del animal.

Los animales deben ser criados en un ambiente donde la temperatura óptima se encuentra dentro del rango que permita mantener la temperatura corporal con un mínimo de actividad metabólica (20-24 °C, humedad relativa ± 60%). Los animales están expuestos a un ciclo artificial de luz desde las 8 de la mañana hasta las 8 de la noche, un movimiento de 15 a 20 cambios de aire fresco (no recirculado) por hora y con un nivel de ruido no mayor a los 85 decibeles.

Además, los ratones son agrupados en lotes que no sobrepasan los 10 individuos por jaula, recibiendo agua y alimentos *ad libitum*.

Por lo tanto, es preferible descartar a todos los animales contaminados, limpiar y desinfectar el bioterio, luego empezar un nuevo protocolo con animales sanos. (77)

El recurso humano tiene una extraordinaria importancia en el éxito de un experimento, ya que va a ejercer influencia sobre los otros factores antes mencionados. Se puede contar con un equipamiento e instalaciones modernas, con los requerimientos que necesita la especie con la cual se va a realizar el

estudio, pero si a esta instalación y al equipamiento no se les realiza un mantenimiento adecuado y una manipulación correcta, esto va a incidir de forma negativa sobre el bienestar animal y por tanto, los resultados obtenidos no serán confiables.

El personal vinculado a la experimentación con animales va a ser además, el encargado de realizar el diseño del experimento y el manejo de los animales para lo cual es importante conocer la biología y etiología de la especie en cuestión. Por eso, es esencial contar con un personal debidamente entrenado, motivado y que esté consciente de que cualquier estudio con animales puede producir en este estrés o este dolor, por lo que cualquier esfuerzo es poco para tratar de minimizarlo sin afectar el objetivo del experimento.

Un personal bien entrenado y actualizado en el cuidado y uso del animal de laboratorio es esencial para asegurar la conformidad con las normas éticas y deben ser consideradas en la acreditación de laboratorios. Se debe considerar como tarea principal la educación bajo principios éticos de científicos y especialistas que trabajan con animales. Esta labor educativa debe comenzar desde estudios de pregrado y continuar a lo largo de la vida laboral. [77]

Criterios de Bioseguridad.

- Prohibir el ingreso a personas ajenas al laboratorio y/o bioterio, para evitar el hacinamiento y el estrés de los animales en experimentación.

- Utilizar mandiles, mascarillas y guantes durante la evaluación toxicológica. Todas las muestras biológicas deben ser tratadas como altamente infecciosas. Desinfectar las superficies de trabajo en forma permanente.

- Reducir el riesgo de contaminación, manteniendo las manos lejos de la boca, nariz, ojos y cara.

Capitulo IV

4.1. RESULTADOS

La **Tabla Nº 02:** muestra el recuento total de espermatozoides normales y anormales, a la dosis de 1600 mg/kg, por grupo experimental, se aprecia un mayor número (6784) de espermatozoides normales en el grupo tratado con *Berberis vulgaris* y un mayor número de espermatozoides anormales (2468) en el grupo tratado con Ciclofosfamida.

Tabla Nº 02. Recuento total de espermatozoides Normales y Anormales en ratones por grupo experimental.

Tratamiento	Tipos de espermatozoides	
	Normales	Anormales
Berberis vulgaris 1600mg/Kg/pc	6784	813
Desmodium mollicum HBK *D.C.*1600mg/Kg/pc	6740	847
Schukurhia pinnata var. Octarristata 1600mg/Kg/pc	6681	844
Gentianella alborosea (Ging) Fabris. 1600mg/Kg/pc	6648	890
Tiquilia paranychioides 1600mg/Kg/pc	6773	812
Control negativo: solución salina al 0.9%	6725	930
Control positivo: Ciclofosfamida 40mg/kg/pc	4717	2468

Fuente : Cuaderno de apuntes
* $p < 0.05$

La **Tabla N°03**: muestra que los extractos acuosos liofilizados de las cinco especies vegetales evaluadas a dosis de 1600 mg/kg, no presentaron diferencias significativas de espermatozoides anormales en relación al control negativo; en la evaluación se evidenció que la presencia de espermatozoides anormales sólo es significativa cuando se administró Ciclofosfamida.

Tabla N° 03. Porcentaje de Promedios y Desviación Estándar de Espermatozoides Normales y Anormales en ratones por grupo experimental

Tratamiento	Tipos de espermatozoides	
	Normales (%) X + DS	Anormales (%) X + DS
Berberis vulgaris 1600mg/Kg/pc	89.29± 13.29	11.91± 1.58
Desmodium mollicum HBK D.C.1600mg/Kg/pc	88.84± 13.55	11.16± 0.06
Schukurhia pinnata var. Octarristata 1600mg/Kg/pc	88.78± 8.78	11.22± 2.07
Gentianella alborosea (Ging) Fabris. *1600mg/Kg/pc*	88.19± 9.55	11.81± 1.88
Tiquilia paranychioides 1600mg/Kg/pc	89.29± 12.35	10.71± 1.12
Control negativo: solución salina al 0.9%	87.85 ± 26,23	12.15 ± 3,61
Control positivo: Ciclofosfamida 40mg/kg	65.42 ± 31,48	34.58 ± 62,77

Fuente : Cuaderno de apuntes
* $p < 0.05$

En la **Tabla Nº 04:** se muestra los números de espermatozoides anormales por grupo experimental. El mayor número de espermatozoides amorfos, banana y sin ganchos con 851, 250 y 1577 respectivamente.

Tabla Nº 04. Recuento total de espermatozoides de tipo amorfo banana y sin gancho de ratones por grupo experimental

Tratamiento	Tipos de Espermatozoides anormales		
	Amorfo	Bananas	Sin gancho
Berberis vulgaris 1600mg/Kg/pc	646	102	65
*Desmodium mollicum HBK D.C.*1600mg/Kg/pc	668	100	79
Schukurhia pinnata var. Octarristata 1600mg/Kg/pc	649	104	91
Gentianella alborosea (Ging) Fabris. 1600mg/Kg/pc	679	113	98
Tiquilia paranychioides 1600mg/Kg/pc	669	83	60
Control negativo: solución salina 0.9%	484	250	196
Control positivo: Ciclofosfamida 40mg/kg	851	65	1577

Fuente : Cuaderno de apuntes
* $p < 0.05$

La **Tabla N° 05:** muestra los porcentajes de promedio y desviación estándar por grupo experimental de espermatozoides con cabezas anormales (criterio de genotoxicidad), sólo se observó en el grupo tratado con ciclofosfamida a diferencia de los grupos tratados con los extractos vegetales a dosis de 1600mg/kg.

Tabla N° 05. Porcentaje de Promedios y Desviación Estándar de espermatozoides Anormales en ratones por grupo experimental

Tratamiento	Tipos de espermatozoides anormales		
	Amorfos	Bananas	Sin gancho
Berberis vulgaris 1600mg/Kg/pc	8,51±10.70	1.34±5.38	0.86±2.41
*Desmodium mollicum HBK D.C.*1600mg/Kg/pc	8.80±13.91	1.32±6.70	1.04±5.73
Schukurhia pinnata var. Octarristata 1600mg/Kg/pc	8.62±12.77	1.38±5.68	1.21±3.57
Gentianella alborosea (Ging) Fabris. 1600mg/Kg/pc	9.01±8.43	1.50±7.72	1.30±4.33
Tiquilia paranychioides 1600mg/Kg/pc	8.82±12.42	1.09±4.43	0.79±2.70
Control negativo: solución salina al 0.9%	6.32±20.85	3.27±6.18	2.56±8.89
Control positivo: Ciclofosfamida 40mg/kg	11.80±7.60	0.90±2.47	21.87±23.87

Fuente : Cuaderno de apuntes
* $p < 0.05$

GRAFICO N° 01

Análisis de Varianza de las Medias Poblacionales de los Espermatozoides con Cabezas Normales en los Grupos Experimentales a los 35 días de la Evaluación.

Leyenda:
Grupo *Berberis vulgaris* L: Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo *Desmodium molliculum* (HBK) D.C Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo *Schukurhia pinnata* var. Octarristata: Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris: Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo *Tiquilia paranychioides*: Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo control negativo: Dosis 0.5mg/25g
Grupo Control Positivo 4: Dosis 40 mg/kg

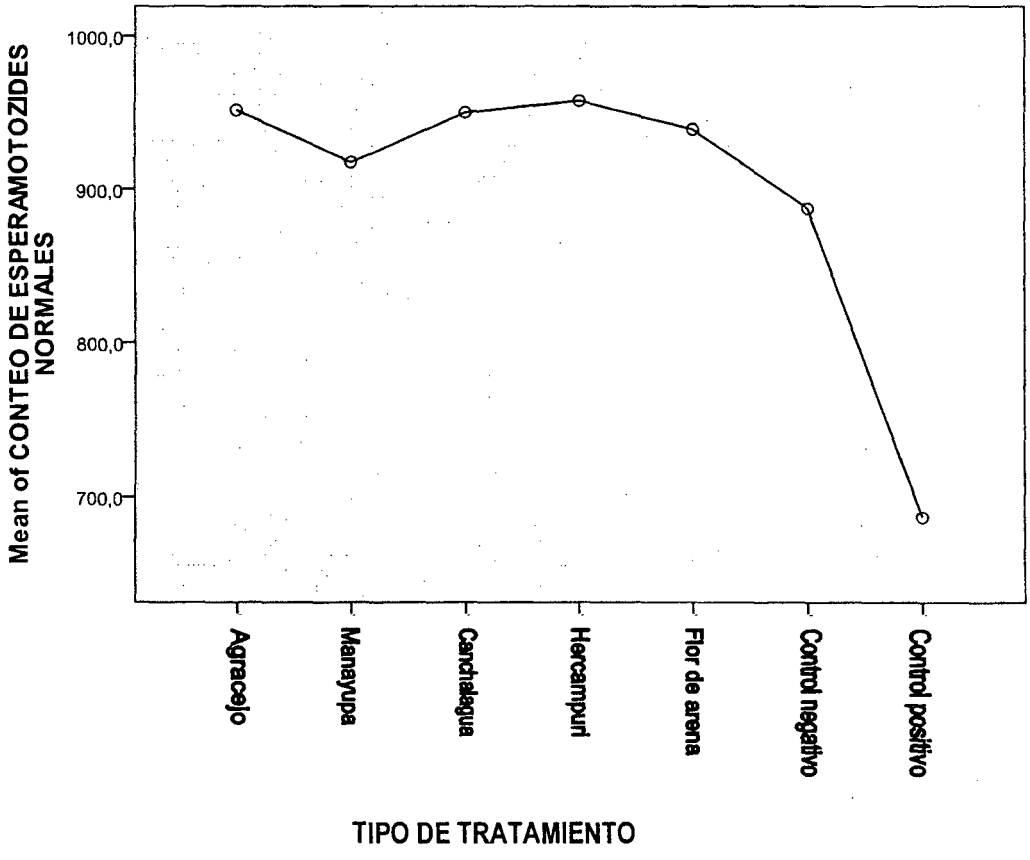


GRAFICO Nº 02

Análisis de Varianza de las Medias Poblacionales de los Espermatozoides con Cabezas Anormales en los Grupos Experimentales a los 35 días de la Evaluación.

Leyenda:
Grupo *Berberis vulgaris* L: Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo *Desmodium molliculum* (HBK) D.C Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo *Schukurhia pinnata* var. Octarristata: Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris: Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo *Tiquilia paranychioides*: Dosis de 1600 mg/Kg.
Grupo control negativo: Dosis 0.5mg/25g
Grupo Control Positivo 4: Dosis 40 mg/kg

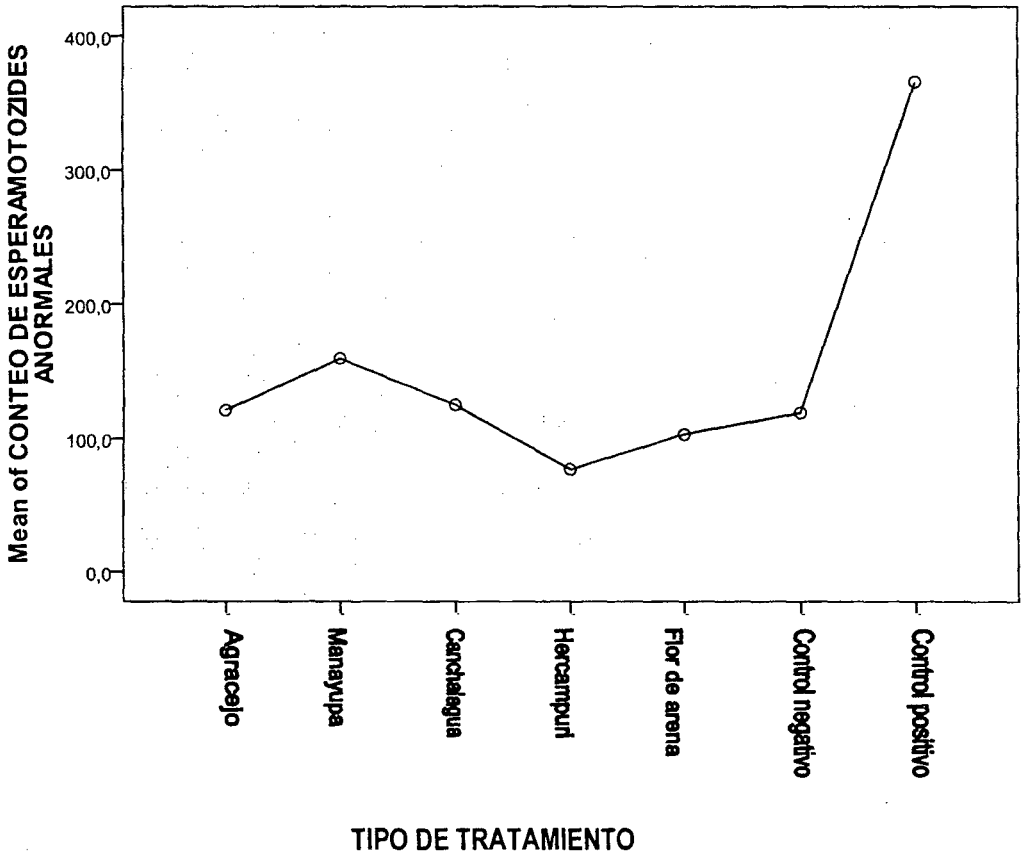


Tabla Nº 06

Porcentaje de Promedios y Desviación Estándar de los Pesos de testículos y epidídimos de los ratones tratados con los extractos acuosos liofilizados a dosis 1600 mg/kg

Tratamiento	**Peso de Testículos (%)** x±S.D	**Peso de Epidídimos (%)** x ±S.D
Berberis vulgaris L	0.201 ± 0.032	0.052 ± 0.011
Desmodium molliculum (HBK) D.C	0.209 ± 0.032	0.061 ± 0.007
Schukurhia pinnata var. Octarristata	0.189 ± 0.035	0.056 ± 0.009
Gentianella alborosea (Ging) Fabris	0.208 ± 0.028	0.061 ± 0.011
Tiquilia paranychioides	0.194 ± 0.027	0.050 ± 0.009
Control negativo: Solución salina al 0.9%	0.189 ± 0.038	0.065 ± 0.007
Control positivo: Ciclofosfamida 40mg/kg	0.198 ± 0.014	0.058 ± 0.011

Fuente : Cuaderno de apuntes

Leyenda : **x** = promedio, **S.D** = Desviación Estándar

* $p < 0.05$

4.2. DISCUSIÓN

Los estúdios de genotoxicidad constituyen un paso importante en la evaluación toxicológica de los medicamentos de origen sintético y vegetal; estos últimos, son mezcla de sustancias con determinada acción terapéutica, sobre todo si tenemos presente la teoría de que las mutaciones pueden ocasionar procesos carcinogénicos, teratogénicos y alteraciones genéticas a la descendencia.

Los ensayos que se realizan en células germinales son indispensables para determinar si un agente se comporta como un riesgo de mutaciones en estas células, mutaciones que pueden tener efectos sobre la salud de generaciones futuras. Los ensayos más utilizados se realizan en el ratón (Mattison & Thomford, 1989; Huff, 1993), tal es el caso de la prueba de anomalías en la cabeza del espermatozoide, la cual se ha usado para medir el daño o trastorno en la espermatogénesis y mutación en células germinales inducida por agentes físicos, químicos, etc. La forma normal de la cabeza de las células espermáticas del ratón son muy distintivas, y cualquier anormalidad puede ser fácilmente identificado. En general, la incidencia de cambios espontáneos en la morfología es baja, y los tipos de esperma anormalmente formados son notablemente característicos en dicho animal (Wyrobek & Bruce, 1975; Wyrobek, 1979).

Resulta imprescindible para estos ensayos la utilización de un control negativo (vehículo solvente de los compuestos evaluados), pues las respuestas genotóxicas y tóxicas de dichos compuestos se evidencian en la comparación con los valores de sus respectivos controles.

Gonzales & Pinedo (2008), realizaron un estudio de Genotóxico de los extractos Acuosos Liofilizados de *Croton lechleri, Uncaria guianensis y Uncaria tomentosa,* por medio del método de anomalías en la cabeza del espermatozoide del ratón, concluyeron que no presentaron acción genotóxica.

Ramirez (2009), realizó la de Evaluación Genotóxica del extracto Acuoso Liofilizado de *Myrciaria dubia*, por medio del método de anomalías en la cabeza del espermatozoide del ratón, concluyendo que no presento acción genotóxica.

Los resultados obtenidos en la evaluación genotóxica indican que los extractos liofilizados de *Berberis vulgaris L, Desmodium molliculum* (HBK) D.C, *Schukurhia pinnata* var. Octarristata, *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris y *Tiquilia paranychioides* a dosis de 1600 mg/kg/p.c, administrados por vía oral, no mostraron actividad genotóxica ni causaron daño en la espermatogénesis, conclusión que fue determinada por la baja frecuencia de espermatozoides anormales y peso de los testículos.

En el caso del control positivo (ciclofosfamida), el peso de los testículos fue ligeramente bajo pero no significativamente diferente respecto a los grupos tratados con los extractos; pero no para el grupo control negativo (solución salina al 0.9%); sin embargo cuantitativamente los espermatozoides anormales fueron significativamente mayores que el de los otros grupos.

La ausencia de genotoxicidad de los extractos de las plantas medicinales estudiadas puede deberse a que los componentes presentes no tienen efecto sobre los procesos hereditarios, además de ser incapaces de atravesar la barrera sangre – testículo, o en último caso no existen componentes con acción mutagénica, o de existir componentes antimutagenos. Los cuales organismos han desarrollado mecanismos, que por cierto están muy conservados evolutivamente, para atrapar a los radicales libres.

Es importante considerar la existencia de condiciones propias de la fisiología animal como son los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción; de manera que el presunto agente genotóxico de la planta podría ser inactivado por diferentes sistemas enzimáticos, entre ellos el hepático, y por tanto incapaz de desencadenar daño a nivel de ADN (Ashby; 1993). Diversos factores como las infecciones, reacciones alérgicas, stress, cambios en la temperatura corporal, flujo sanguíneo, absorción intestinal deficiente, etc; podrían contribuir a la atenuación, presencia o ausencia de una respuesta genotóxica in vivo, es decir que pueden modificar los valores espontáneos en la prueba (Wyrobek & Bruce, 1975); afirmación que es válida, por lo cual es posible que el estado de salud de los ratones y las condiciones no óptimas de mantenimiento para estos animales tengan efectos negativos sobre las células germinales y por ende en la espermatogénesis.

4.3. CONCLUSIONES

- En las condiciones de ensayos descritas, el extracto acuoso a dosis de 1600 mg/kg/pc de *Berberis vulgaris L* no presentó acción genotóxica, ya que no indujo un incremento significativo en las anomalías morfológicas de los espermatozoides.
- En las condiciones de ensayos descritas, el extracto acuoso a dosis de 1600 mg/kg/pc de *Desmodium molliculum* (HBK) D.C no presentó acción genotóxica, ya que no indujo un incremento significativo en las anomalías morfológicas de los espermatozoides.
- En las condiciones de ensayos descritas, el extracto acuoso a dosis de 1600 mg/kg/pc de *Schukurhia pinnata* var. Octarristata no presentó acción genotóxica, ya que no indujo un incremento significativo en las anomalías morfológicas de los espermatozoides.
- En las condiciones de ensayos descritas, el extracto acuoso a dosis de 1600 mg/kg/pc de *Gentianella alborosea* (Ging) Fabris no presentó acción genotóxica, ya que no indujo un incremento significativo en las anomalías morfológicas de los espermatozoides.
- En las condiciones de ensayos descritas, el extracto acuoso a dosis de 1600 mg/kg/pc *Tiquilia paranychioides* no presentó acción genotóxica, ya que no indujo un incremento significativo en las anomalías morfológicas de los espermatozoides.
- En las condiciones de ensayos descritas, el grupo control positivo tratado con Ciclofosfamida a 40 mg/Kg./pc si mostro acción genotóxica, observando la frecuencia de anomalías en los espermatozoides; como pueden ser

cabezas amorfas y sin gancho, confirmando la acción no genotóxica de las especies vegetales por el método de Anomalías en la cabeza del espermatozoide del ratón.

4.4. RECOMENDACIONES

- Asegurar la calidad del ambiente en que se mantienen y desarrollan los ratones albinos cepa Balb/c - CNPB, además de tener presente los criterios de inclusión descritos anteriormente al momento de seleccionar éstos animales para el estudio.

- Efectuar estudios de genotoxicidad como la Prueba del Cometa y el Test de Ames para complementar los estudios de genotoxicidad en esta especie.

- Continuar con las investigaciones en el campo de productos naturales, en especial las plantas de uso popular con que cuenta nuestro Perú, y afianzar los estudios en genotoxicidad de las plantas que fueron evaluadas.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1) KRAMER PJ (1999) Genetic toxicology. J-Pharm-Pharmacol 4. 395-405.

2) ECOBICHON DJ (1993) Mutagenesis. The basis of toxicity testing. Mc Gill University, Montreal. De. CRC, INC, Boca Ratón, Florida. 113-136.

3) OECD (1993) Organización Económica de Cooperación y Desarrollo. uidelines for the Testing of Chemicals # 475: Genetic Toxicology. Micronucelus test. OECD Publication service, 2 rue Andre-Pascal, 75775, Paris Cedex 16, France.

4) ICH Genotoxicity (1995): Guidance on specific aspects of regulatory genotoxicity tests for pharmaceuticals. 4, Final, july.

5) BARRUECO C, GUADAÑO A., CABALLO C., HERRERA A, VALCARCE E. Y DE LA PEÑA E (1999) Evaluación Mutagénica y Genotóxica de los Productos Químicos. En: Evaluación Mutagénica y Genotóxica . de la Peña E., Burguete I. y Guadaño A. eds. DGICyT, MRCIA98- SEMA. Madrid. 271-288.

6) WALL M, WANI M (1993). 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, p 87-97.

7) ALICE C, VARGAS V, SILVA G, DE SIGUEIRA N, SCHAPOVAL E, GLEVE J, HENRIQUES A (1991). Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. Journal of Ethnopharmacology. 35, p 165-171.

8) VOLAK, JAN , (1997). Plantas medicinales, Editorial Su saeta.

9) MORRIS RICH, (1999). Plantas para el futuro.

10) BELLO J. LOPEZ DE CERAIN A. (2001) Fundamentos de ciencias toxicológicas Editorial Días de santos – Madrid- España.

11) LOJA HERRERA B. (2002). Contribución al estudio florístico de la provincia de Concepción, (Junín): Dicotiledóneas. Tesis para optar el titulo de Químico Farmacéutico UNMSM. Pp. 79.

12) http://www.hipernatural.com/es/pltaracejo.html

13) VALDIZAN H, MALDONADO A. (1922). La medicina popular peruana. Tomo II. Lima-Perú.

14) http://www.alimentacion-sana.com.ar

15) VARGAS L. VARGAS R, NACCARATO P. (1995). De Salvia y Toronjil Guía de Medicina Natural para la Salud de la Mujer. Ed. Grafico Bellido. Lima-Perú; p:35

16) http://www.ptnsa.com/flor-de-arena.html

17) BRUSICK DJ. (1998). Fundamental of genetic toxicology. New York: Academic Press; p: 142-163.

18) CAIRNS J, OVERBAUGH J, MILLER S. (1988). The origin of mutants. Nature; p: 335: 142-145.

19) BICKHAM JW, SMOLEN MJ. (1997) Somatic and hereditable effects of environmental genotoxins and the emerge of evolutionary toxicology. Envison Health Perspect; p: 12: 15-80.

20) VAN GAETHEM. (1999). Identification of clastogenic and / or aneugenic events during the preneoplastic stages of exprrimental rat hepatocarcinogenesis by fluorescent in situ hybridization . Carcinogénesis. 16 (8): 1825-1834.

21) TESMANT RW, ZEIGER E., et-al. (1997). Prediction of chemical of carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. Science; p: 236: 933-941.

22) BRUSICK DJ. (1999). Alterations of germ cells leading to mutagenesis and their detection. Environ Health Perspect; p: 74: 105-112.

23) REPETO M. (1995) Toxicología especial. Editorial Días de santos – Madrid. Pág. 291-302

24) BETANCOURT, B, J. E. (1999). Cuestiones éticas en la experimentación animal.doc.

25) MORTON D. B. (1997) Importancia ética del sufrimiento de los animales para los profesionales responsables de su atención. Animales de experimentación. Pág. 3,2,9-11.

26) WASSON J. S (1989) Environ. Mol. Mutag. 14: 1-6

27) BRUSICK D. J. (1977) En: Cutaneous toxicity, (V. A. DRILL y P. LAZAR, Eds.)Academic Press, New York, pp. 189-201

28) FEDERAL REGISTER U. S. A., (1978) 43: 50140-50147

29) BROCKMAN H. E., DE MARINI D. M. (1988) Environ. Mol. Mutag. 11: 421-435

30)DEAN B. J. (Ed) (1983) Report of the U.K.E.M.S. sub-committee on guidelines for mutagenicity testing. Part I Published. By the United kingdon environmental Mutagen Society.

31) HEALTH AND WELFARE, (1986) Guidelines on the use of Mutagenicity, tests in the toxicological evaluation of chemicals. Advisory committee on mutagenesis, Ottawa, Canada.

32) ASHBY J (1986) Mutagenesis 1: 3-16

33) U. S. EPA, (1983) HAzard Evaluation: human and domestic animals MTIS, Springfield. V.A.

34) RUSSELL L.B., M. D. Shelby (1985) Mutation Res. 154: 69-84

35) DIOSCORIDES RENOVADO POR EL DR. P.SOT QUER. (1976). Plantas Medicinales. Editorial Labor. S.A. Barcelona – Madrid – Bogota – Buenos Aires.

36) http://fichas.infojardin.com/arbustos/berberis-vulgaris-agracejo-agrazon.htm

37) MENÉNDEZ VALDERREY, Juan Luis. "Berberis vulgaris Subs. Cantabrica Rivas Mart., T.E. Díaz, Fern. Prieto, Loidi y Penas".

38) http://www.cepvi.com/medicina/plantas/berberis2.shtml

39) http://www.asturnatura.com/especie/berberis-vulgaris-subsp-cantabrica.html

40) AVILA AB, CONQUI IR. (1994). Efectos antiinflamatorio del decocto de Desmodium mollicum (H.B.K) D.C. en piel de Oryctolagus cunniculus. Tesis Bach. Farmacia.

41) ROSAS LH. (1985). Estudios fitoquimico y ensayo antianafiláctico del extracto de la especie Desmodium mollicum (H.B.K) D.C. en Cavia parecllus. Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

42) COCUERA BC (1986). Efecto diurético del decocto de Desmodium mollicum (H.B.K.) D.C. en Rattus rattus var albinus. Tesis. Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

43) SERVICIO DE MEDICINAS PRO-VIDA. (1997). Guía de plantas de uso medicinal. 1era ed. Ed. Servicio de Medicinas Pro-Vida. Lima-Perú; pp. 81-3

44) ROERSCH C. (1994). Plantas Medicinales en el sur Andino del Perú. Vol II. Centro de Medicina Andina. Cusco-Perú; PP: 907-10

45) VARGAS L, VARGAS R, NACCARATO P. (1995). De Salvia y Toronjil Guía de Medicina Natural para la Salud de la Mujer. Ed. Grafico Bellido. Lima-Perú; pp: 32,156

46) DELGADO DV, GUZMAN MP. (1993). Estudios fitoquimico de la especie de Schukurhia pinnata var. Octaristata "canchalagua" y ensayo del efecto antiinflamatorio de su extracto acuoso en muslo de Oryctolagus cunniculus. Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

47) UNIVERSIDAD DE LIMA. (1994). Catalogo de Plantas Medicinales. Facultad de Ingeniería Industrial. (CIPI). Perú; pp:56-7

48) VARGAS L. VARGAS R, NACCARATO P. (1995). De Salvia y Toronjil Guía de Medicina Natural para la Salud de la Mujer. Ed. Grafico Bellido. Lima-Perú; p:35

49) URBINA D, GONZALES EE. (2000). Efecto del infuso de hojas y flores de Schukurhia pinnata var. Octaristata "canchalagua" sobre la diuresis de Rattus rattus var. Albinus. Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

50) SANCHEZ Z: Hercampuri Gentianella alborosea. Natura Medicatrix. España. 1999; 52: 44-5

51) KAWAHARAN N, NOZAWA M, FLORES D, BONILLA P, SEKITA S, SATAKE M. (1996). Chemical components of peruvian Fol. Medicine "hercampuri" (Gentianella alborosea). Libro Resumen III Congreso Nacional de Ciencia Farmacéuticas y bioquímicas. Academia Peruana de Farmacia. Lima-Perú; pp;33,146,150

52) BRACK A. (1999). Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú. Ed. Centro de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cusco – Perú; p: 222.

53) SERVICIO DE MEDICINAS PRO-VID. (1997.: Guía de plantas de uso medicinal. 1era ed. Ed. Servicio de Medicinas Pro-vida. Lima-Perú; pp:113-5

54) LLANOS WC, LLAMOCA MP. (1995). Efectos de decocto de Gentianella alboroseae en Oryctolagus cunniculus con hiperlipidemia inducida. Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

55) BECERRA JL. (1993). Estudio morfo-histotaxonómico e identificación de los fitoconstituyentes de la especie Gentianella alboroseae (Ging) Fabris "Hercampuri". Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

56) VARGAS L, VARGAS R, NACCARATO P. (1995). De Salvia y Toronjil Guía de Medicina Natural para la Salud de la Mujer. Ed. Grafico Bellido. Lima – Perú; pp.:33, 146, 150.

57) CORTIJO PM, RODRIGUEZ SP. (1998). Efecto diurético del infuso de Gentianella alboroseae en Rattus rattus var. Albinus y su comparación de furosemida e hidroclorotiazida. Tesis Bach. Farmacia Universidad Nacional de Trujillo-Perú.

58) TEODORO AGAPITO F, ISABEL SUNG. Fitomedicina 1100 Plantas Medicinales Tomo I. Ed Isabel. Pp: 224,225.

59) http://www.ptnsa.com/flor-de-arena.html

60) http://www.macapunch.com/OTROS%20PRODUCTOS.htm

61) TRAINER, T. 1987. Histology of the normal testis. Am J SURG Pathol. Vol. 11, p. 797.

62) HAMILTON, D; WAITES, G. (1990). Cellular and molecular events in spermiogenesis. Scientific Basics of Fertlity Regulation. World Health Organization. Cambridge University Press. p. 334.

63) JUNQUEIRA, L & CARNEIRO, J. (2002). Histología Básica. Editorial Guanabara Koogan, S.A. MASSON. Barcelona – España.

64) GARTNER, L & HIATT, J. (2003). Histología. 3ra Edición. Edición Médica Panamericana. Madrid – España.

65) BELLVÉ, A; CAVICCHIA, J; CLARKE, C; O'BRIEN, D; BHATNAGAR, Y. (1977). Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. J Cell Biol. Vol. 74, p. 68 – 65.

66) MALKOV, M; FISHER, Y; DON, J. (1998). Developmental schedule of the postnatal rat testis determined by flow cytometry. Biol Reprod. Vol. 59, p. 84 – 92.

67) DYMING, R & FAWCETT, D. (1971). Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. Biol. Reprod. Vol. 4, p. 195 – 215.

68) KUPKER, E; DIEDRICH, K & EDWARDS, R- (1998). Principles of mammalian fertilization. Human Reprod. Vol. 13, Suppl. 1, p. 251 – 271.

69) GUYTON. (2001). "Tratado de Fisiología Médica. Décima Edición. Mc. Graw-Hill Interamerivcana.

70) WARD, W; COFFEY, D. 1991.DNA packaging and organización in mammaliam spermatozoa: comparixon with somatic cells. Biol. Reprod. p. 569 – 574.

71) JUNQUEIRA, L & CARNEIRO, J. (2002). Histología Básica. Editorial Guanabara Koogan, S.A. MASSON. Barcelona – España.

72) FAWCETT, D. (1975). The mammalian spermatozoon. Dev Biol. Vol. 44, p. 394.

73) DIXON, R. (1985). Reproductive toxicology. New York: Raven Press.

74) VINITKET, K.; MATSUSHIMA, T. (1998). Antimutagenicity of Cymbopogon citrates stapf to varians knovon mutagens in salmonella mutation assay a micronucleus test. Mut Res. Vol.341, p. 71 – 5.

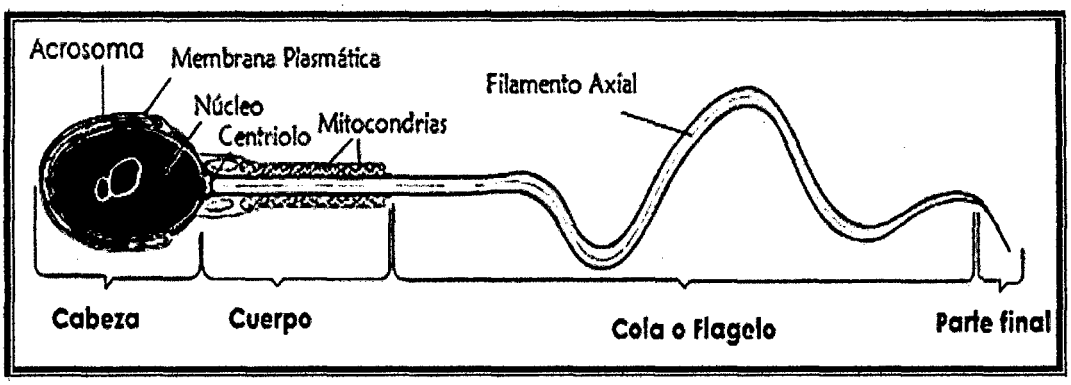
75) R. Rita Misra y Michael P. Waalkes. Mecanismos De La Toxicidad. Toxicología genética

76) BARRUECO, C. et al.1999. Evaluación Mutagénica y genotòxica de los productos químicos. Ed. MRCIA98 – SEMA. Madrid – España: 271- 288.

77) MORTON, D.B. (1997) La importancia ética del sufrimiento de los animales para los profesionales responsables de su atención. Animales de experimentación, 3, 2, 9-11.

4.6. ANEXOS

Anexo Nº 01: Estructura del Espermatozoide



Anexo 02 TABLA DE DOSIFICACION

%	FACTOR DE VOLUMEN (mL x 10 -2) / g. mc.														
[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 Toxico
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	Moderada-mente Toxico
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	600	Ligeramente Toxico
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	
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	Practicamente no Toxico
20	2800	3200	3600	4000	4400	4800	5200	5600	6000	6400	6800	7200	7600	8000	
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	Inocuo
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	
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	
100	14000	16000	18000	20000	22000	24000	26000	28000	30000	32000	34000	36000	38000	40000	

$$V.I. = \frac{\text{Dosis x W}}{\text{[Concentracion]}}$$

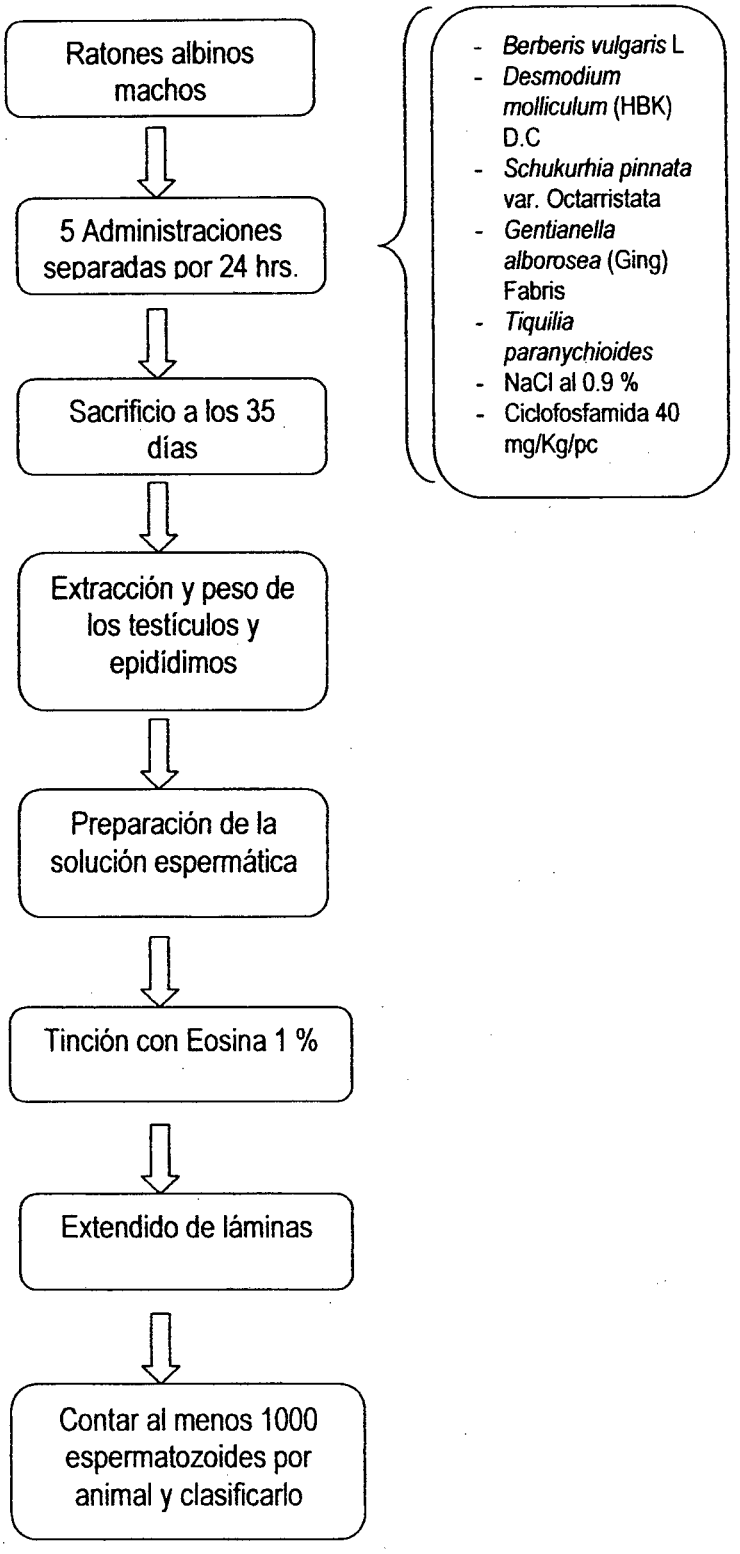
Volumen de Inoculo = V.I (ml) Peso del animal = W (gramos)

Dosis = mg/kg p.c. Factor de Volumen = ml/gr.m.c. [Concentracion] = gr/ml

Fuente: Protocolos de Farmacologia y Toxicologia Experimental-Instituto de Medicina Tradicional- IMET

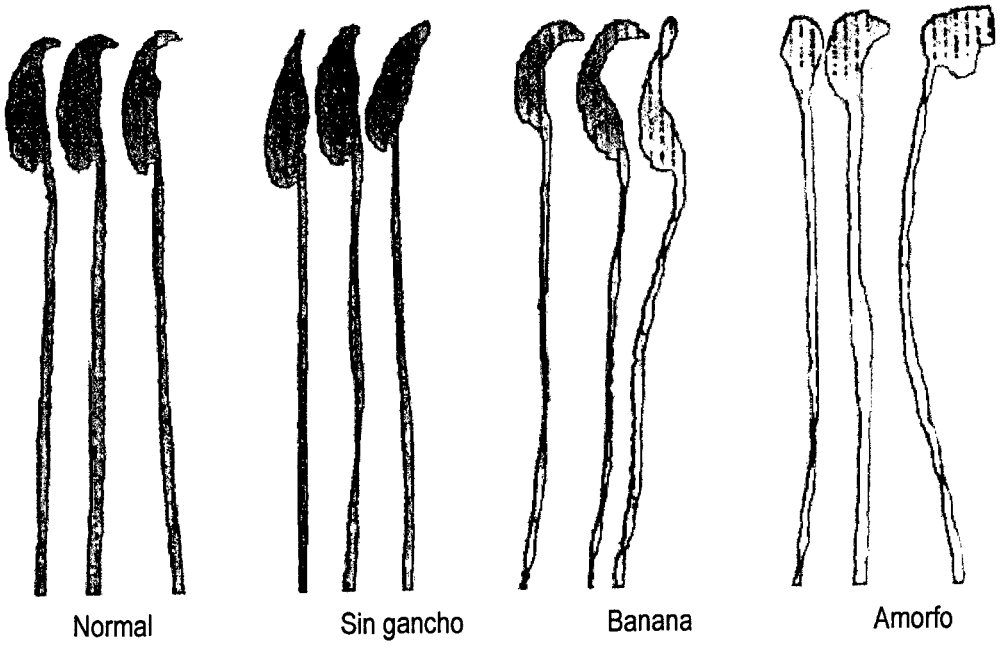
ANEXO Nº 03

Proceso de La Evaluación Genotóxica Mediante El Método de Anomalías en La Cabeza Del Espermatozoide Del Ratón.



ANEXO Nº 04

Morfología De La Cabeza Del Espermatozoide Del Ratón



Fuente. Wyrobek Bruce (1975)

Anexo Nº 05:

Certificados de Identificación Taxonómica de las Especie Vegetal.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM AMAZONENSE (AMAZ)
Apartado Postal 326 – Telef. 22-2649
E-mail herbarium@amaz.com.pe.
Iquitos-Perú

Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza

CERTIFICADO

EL DIRECTOR DELHERBARIUM AMAZONENSE DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA.

CERTIFICA:

Que, las muestras botánicas entregado por el Instituto de Medicina Tradicional-ESSALUD, fue identificado en este Centro de Estudio, Investigación y Enseñanza como a continuación se indica:

Familia	Nombre Científico	Nombre Vulgar
- BERBERIDACEAE	*Berberis vulgaris L.*	"Agracejo"
- ASTERACEAE	*Schkuhria pinnata var. Octoaristata*	"Canchalagua"
- BORAGINACEAE (Ehretiaceae)	*(Tiquilia paronychioides)*	"Flor de Arena"
- GENTIANACEAE	*Gentianaceae alborosea (*Gil) Fabris	"Hercampuri"
- FABACEAE	*Desmodium molliculum* (H.B.K) DC.)	"Manayupa"

Se expide el presente Certificado, a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

Iquitos, 24 de Setiembre del 2009

Blgo. Dr. Manuel Flores Arévalo
Director (e) de AMAZ

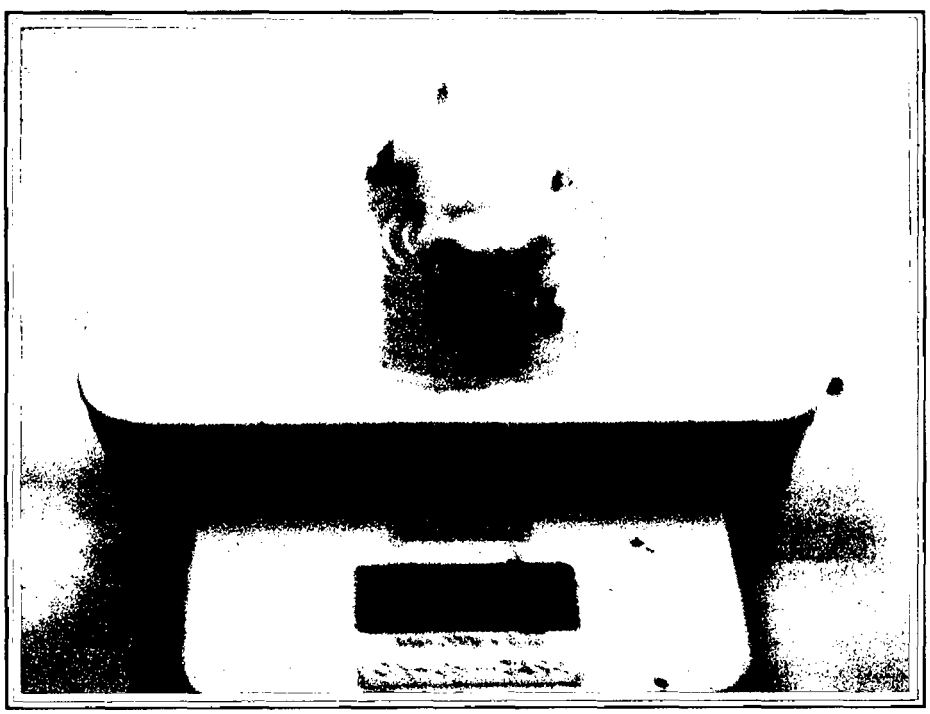
FOTOS

Fotos Nº 01.

Selección y Marcaje de los ratones macho.

Foto Nº 02

Pesaje de ratones



Fotos Nº 03

Administración de las Sustancias

Foto N°04

Sacrificio de los animales por Dislocación cervical

Foto N°05

Peso de los testículos y epidídimos

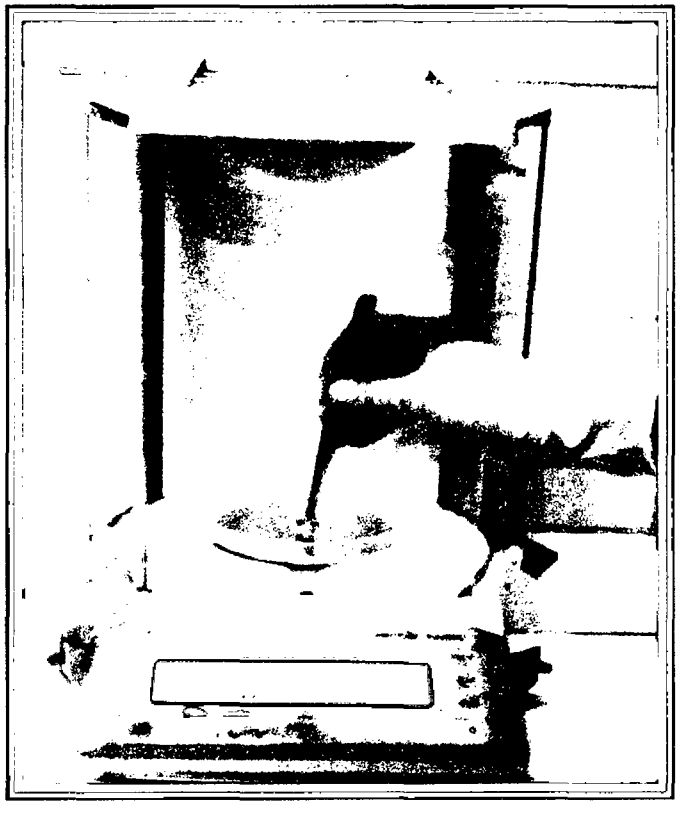


Foto Nº 06

Adición de Solución salina en placas conteniendo los epidídimos

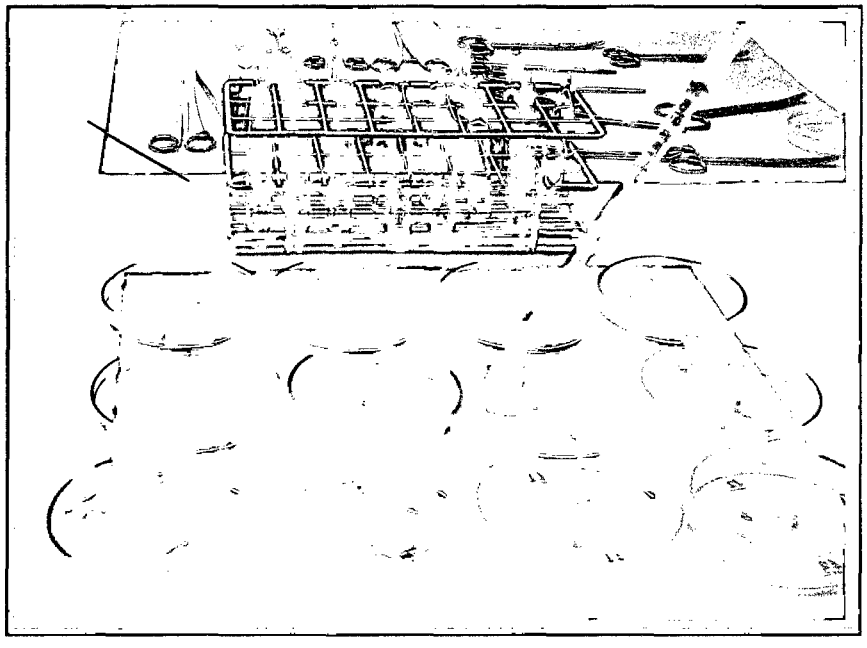


Foto Nº 07

Preparación de la solución espermática

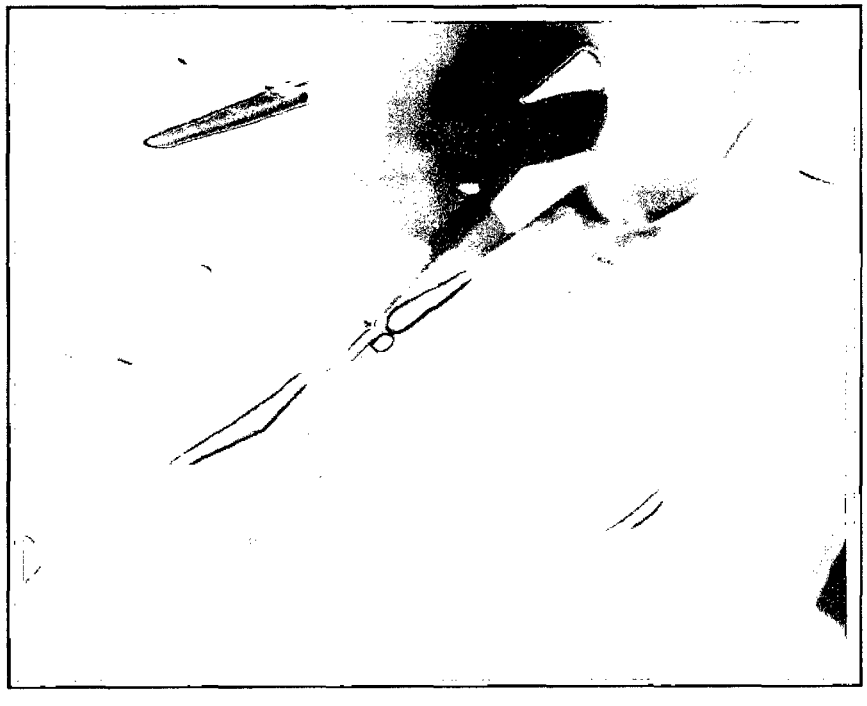
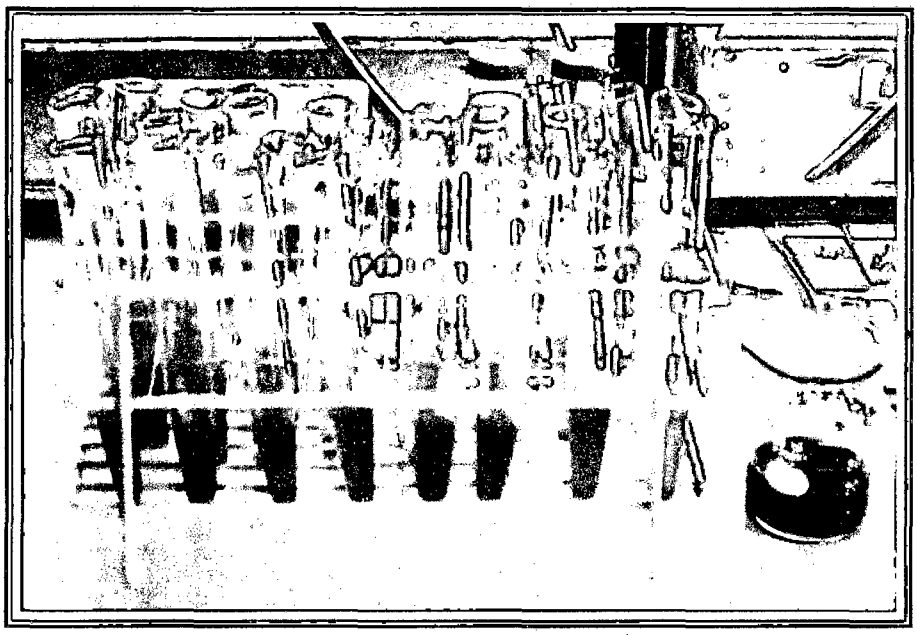


Foto Nº 08

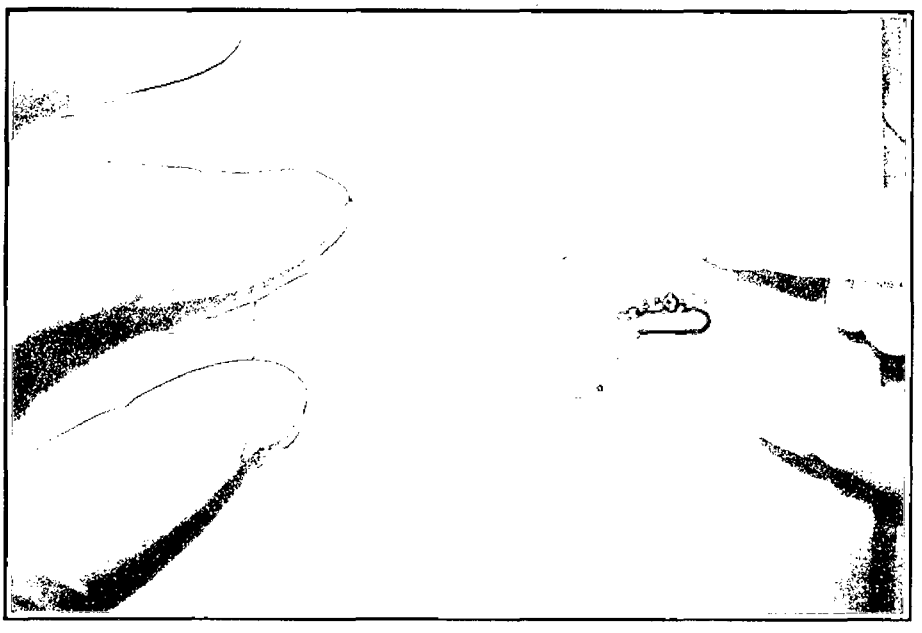
Coloración de la solución espermática



Fotos Nº 09

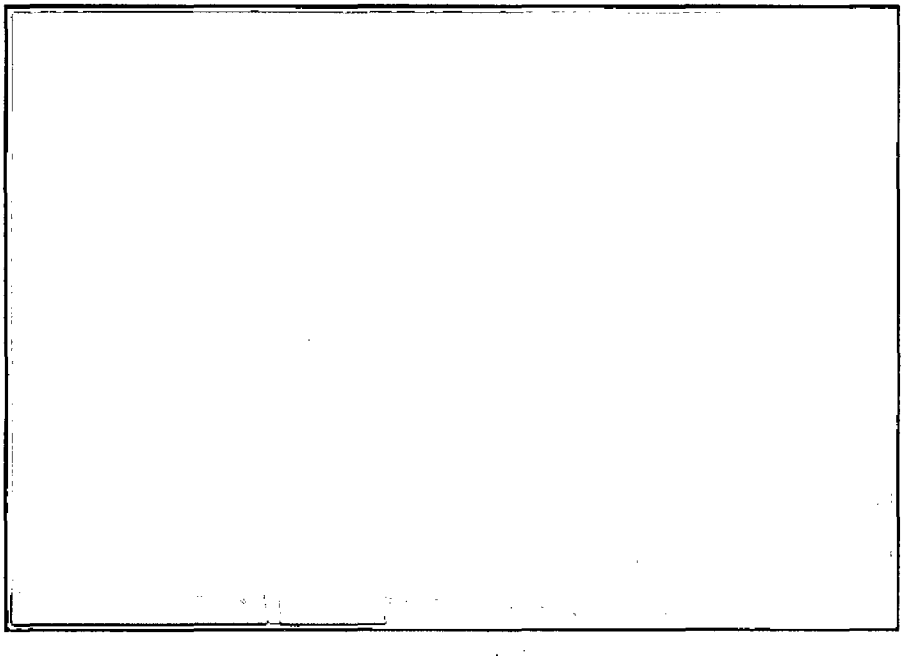
Extendido de las láminas

NO SALE A
DOMICILIO



Fotos Nº 10

Lectura de las láminas



Univ. Nacional de la Amazonia Peruana
BIBLIOTECA CENTRAL
Iquitos - Peru -
: 00038

Foto Nº 11

Espermatozoides normales

Foto Nº 12

Espermatozoide amorfo

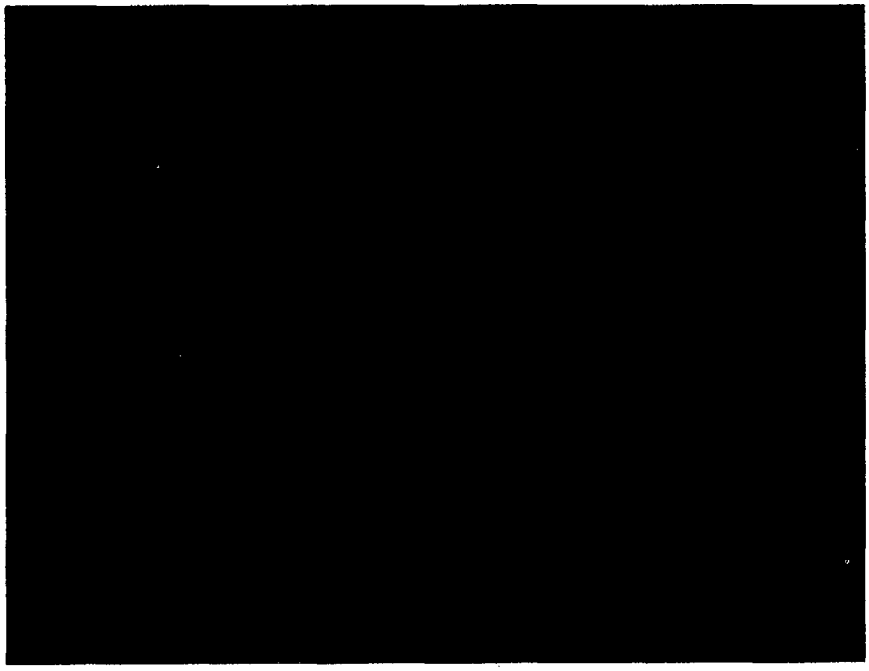


Foto Nº 13

Espermatozoide sin gancho

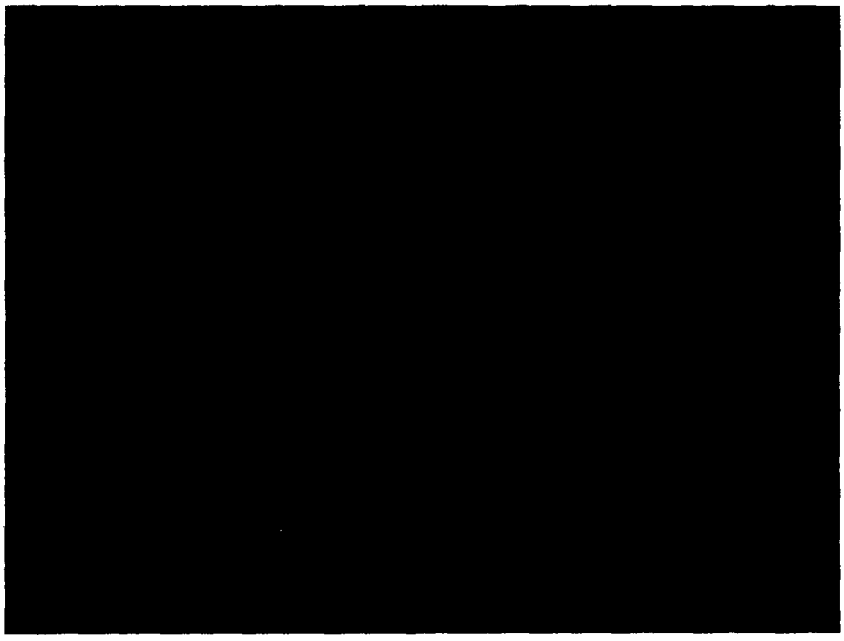
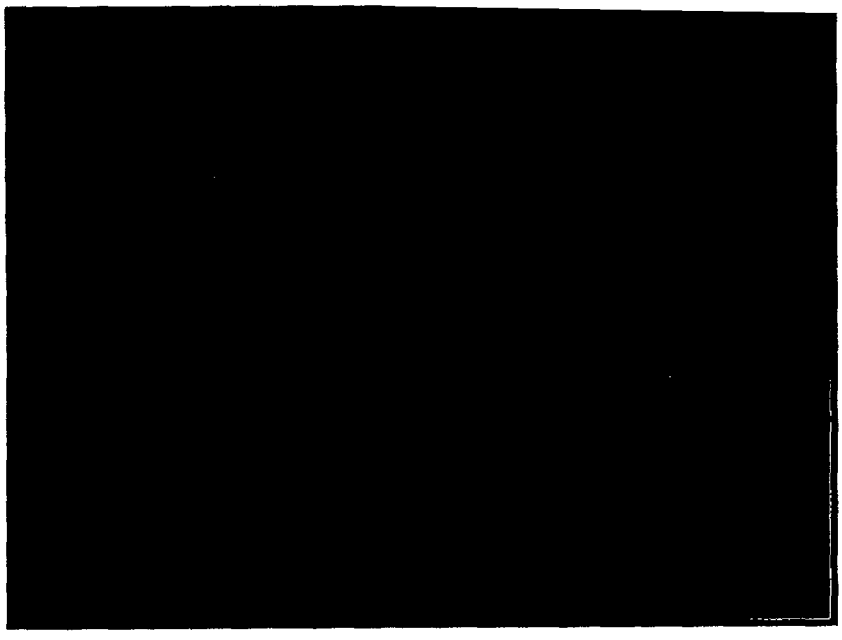


Foto Nº 14

Espermatozoide banana