Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Efecto del extracto liofilizado de Laccopetalum giganteum "Pacra Pacra" en la calidad reproductiva de ratones machos sometidos a tratamientos oncológicos

TESIS
Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

AUTOR

Yojaira Estéfani ORÉ ACEVEDO

ASESOR

José Luis Rafael PINO GAVIÑO

Lima, Perú

2026



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Oré, Y. (2026). *Efecto del extracto liofilizado de Laccopetalum giganteum "Pacra Pacra" en la calidad reproductiva de ratones machos sometidos a tratamientos oncológicos*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Yojaira Estéfani Oré Acevedo
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73736377
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-4139-3771
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	José Luis Rafael Pino Gaviño
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25594149
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-7675-5715
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Fernando Octavio Retuerto Prieto
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	08212301
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Rosa Antonia Gonzales Gonzales
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06931752
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Zeze Humberto Bravo Gutierrez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42952975
Datos de investigación	

Línea de investigación	A.1.3.4. Reproducción
Grupo de investigación	Reproducción, biología del desarrollo y ecotoxicología
Agencia de financiamiento	Sin financiamiento
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas - Universidad Nacional Mayor de San Marcos País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Calle: Av. Germán Amézaga 375, Ciudad Universitaria. Latitud: -12.059701 Longitud: -77.082147
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Diciembre 2026 – Abril 2026
URL de disciplinas OCDE	Biología Reproductiva https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.08 Salud pública, Salud ambiental https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 14:04 horas del 23 de junio de 2026, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **YOJAIRA ESTÉFANI ORÉ ACEVEDO.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N.º UNMSM-20260047821**, la titulando expuso su Tesis: **EFECTO DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE *Laccopetalum giganteum* "PACRA PACRA" EN LA CALIDAD REPRODUCTIVA DE RATONES MACHOS SOMETIDOS A TRATAMIENTOS ONCOLÓGICOS** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado con máximos honores.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **YOJAIRA ESTÉFANI ORÉ ACEVEDO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 15:00 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 23 de junio de 2026.

FERNANDO OCTAVIO RETUERTO PRIETO
(PRESIDENTE)

JOSE LUIS RAFAEL PINO GAVIÑO
(ASESOR)

ROSA ANTONIA GONZALES GONZALES
(MIEMBRO)

ZEZE HUMBERTO BRAVO GUTIERREZ
(MIEMBRO)

UNMSM Firmado digitalmente por PINO GAVIÑO Jose Luis Rafael FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 24.07.2026 10:48:30 -05:00

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, Decana de América

Certificado de Similitud

Yo, **JOSE LUIS RAFAEL PINO GAVIÑO** en mi condición de asesor acreditado con el Dictamen de la EP N° Dictamen N° 009-2026-EPGBT-FCB de la tesis cuyo título es: **Efecto del extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum* "Pacra Pacra" en la calidad reproductiva de ratones machos sometidos a tratamientos oncológicos**, presentado por la bachiller **YOJAIRA ESTEFANI ORE ACEVEDO** para optar el título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga

CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante la plataforma PIDS, el documento evaluado cuenta con el 6% de similitud, nivel PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional.**

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga.

Lima, 10 de junio de 2026

Firma del Asesor

Nombres y Apellidos del asesor: Blgo. JOSE LUIS RAFAEL PINO GAVIÑO
DNI: 25594149

* Según corresponda: bachiller, magíster, doctor; título profesional o título de segunda especialidad

La vigencia del presente certificado corresponde a un período de noventa (90) días desde la fecha de su emisión; siempre que no haya observaciones en el texto durante el proceso de revisión por el jurado informante o surja alguna contingencia.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano por ser mi base, constancia y mi fuerza.

A mi novio, por su apoyo, paciencia y buen sentido del humor.

Y a mí, por no rendirme nunca.

Este logro también es para quienes confían en la ciencia como una esperanza.

AGRADECIMIENTO

A mi asesor de tesis el Blgo. José Luis Rafael Pino Gaviño, quien con su guía, paciencia y constante apoyo permitió que este trabajo se realice. Además, sus conocimientos, recomendaciones y disciplina permitieron que esta investigación se finalice a pesar de los múltiples obstáculos.

A la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y al Laboratorio 219 de la Facultad de Ciencias Biológicas ya que ahí me dieron el espacio, las herramientas y las facilidades que necesitaba para ejecutar este proyecto. Igualmente, agradezco a los docentes que estuvieron en mi formación académica puesto que muchos de ellos lograron despertar mí interés por la investigación científica a través de sus historias y artículos de investigación; todo ello me permitió y me permite ver el mundo de una forma más completa.

A los ratones y animales de experimentación que fueron utilizados, ya que gracias a su sacrificio este proyecto pudo desarrollarse.

A mis amigos y amigas, ¡Gracias por su apoyo, motivación y por acompañarme durante este largo proceso!, ustedes lograron que los momentos difíciles sean más llevaderos a través de viajes y salidas que muchas veces no pasaron de planes.

Finalmente, a mi familia y a quienes estuvieron presentes a lo largo de este camino, por su apoyo incondicional y confianza en mí.

GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
Cy	Ciclofosfamida
DE	Desviación estándar
DFI	Índice de fragmentación de ADN (DNA Fragmentation Index)
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
Eosina Y	Eosina amarillenta
FDA	Food and Drug Administration
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
HR	Humedad relativa
IF	Índice de fragmentación
INS	Instituto Nacional de Salud de Perú
Kg	Kilogramo
Levene	Prueba de homogeneidad de varianzas de Levene
mg/kg	Miligramos por kilogramo de peso corporal
MINSA	Ministerio de Salud de Perú
MP	Motilidad progresiva
MNP	Motilidad no progresiva
OMS	Organización Mundial de la Salud

PM	Mostaza de fosforamida
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCD	Dispersión de la cromatina espermática
SCSA	Sperm Chromatin Structure Assay
TdT	Terminal deoxinucleotidil transferasa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
η^2	Eta cuadrado (tamaño del efecto)

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN 16

2. MARCO TEÓRICO 18

2.1. Oncofertilidad 18

2.2. Ciclofosfamida 20

2.3. Espermatogénesis 22

2.4. Estrés oxidativo y fragmentación de ADN espermático 24

2.5. Fitoterapia en oncofertilidad 27

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 30

3.1. Hipótesis 30

3.2. Objetivos 30

2.3.2.1. Objetivo General: 30

2.3.2.2. Objetivos Específicos: 30

4. MATERIALES Y MÉTODOS 31

4.1. Material Biológico 31

4.1.1. Animales de experimentación 31

4.1.2. Obtención de Laccopetalum giganteum 31

4.1.3. Materiales de laboratorio 31

4.2. Diseño Experimental 33

4.2.1. Tamaño muestral y grupos de tratamiento 33

4.2.2. Liofilización de Laccopetalum giganteum 33

4.2.3. Determinación, preparación y frecuencia de la dosis de exposición 35
4.2.4. Obtención de espermatozoides de la cola de epidídimo 36
4.2.5. Medición de parámetros espermáticos 36
4.2.6. Concentración espermática 37
4.2.7. Movilidad o motilidad espermática 38
4.2.8. Vitalidad espermática 38
4.2.9. Morfología espermática 39
4.2.10. Fragmentación de ADN espermático (SCD) 40
4.2.11. Análisis estadístico 42
5. RESULTADOS 44
5.1. Obtención de espermatozoides de la cola de epidídimo 44
5.2. Medición de parámetros espermáticos 44
5.3. Concentración espermática 44
5.4. Movilidad o motilidad espermática 46
5.4.1. Motilidad progresiva 46
5.4.2. Motilidad No progresiva 47
5.4.3. Inmóviles 48
5.5. Vitalidad espermática 50
5.6. Morfología espermática 52
5.7. Fragmentación de ADN espermático 53
5.7.1. Distribución de tipos de halo mediante ensayo SCD 53
5.7.2. Índice de fragmentación de ADN 55
6. DISCUSIÓN 57

7. CONCLUSIONES 63

8. RECOMENDACIONES 64

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 65

10. ANEXOS 74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Etapas y variables del ciclo de liofilización de flores de *Laccopetalum giganteum*……..……..…..34

Tabla 2. Diluciones recomendadas para el recuento de la concentración espermática……..38

Tabla 3. Concentración espermática (×10⁶/mL) en ratones BALB/c expuestos a ciclofosfamida y tratados con *Laccopetalum giganteum*…….…..….46

Tabla 4. Espermatozoides con motilidad progresiva (%) en ratones BALB/c expuestos a ciclofosfamida y tratados con *Laccopetalum giganteum*…….……..…47

Tabla 5. Espermatozoides con motilidad no progresiva (%) en ratones BALB/c expuestos a ciclofosfamida y el grupo experimental……..49

Tabla 6. Espermatozoides sin motilidad (%) en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida y *Laccopetalum giganteum*……..50

Tabla 7. Vitalidad espermática (%) en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida y *Laccopetalum giganteum*……52

Tabla 8. Morfología normal espermática (%) en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida y *Laccopetalum giganteum*……..53

Tabla 9. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la distribución porcentual de los tipos de halo (SCD) en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida……...……55

Tabla 10. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre el índice de fragmentación de ADN en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida……57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en la población peruana masculina de 0 a 54 años. 19

Figura 2. Estructura química de la ciclofosfamida en 2D. 22

Figura 3. Organización del epitelio germinal en el túbulo seminífero. 24

Figura 4. Evaluación de la fragmentación del ADN espermático en ratones mediante la técnica de SCD..... 27

Figura 5. Preparación de las flores de *Laccopetalum giganteum* para el proceso de liofilización. 35

Figura 6. Representación esquemática de espermatozoides de ratón normales y anormales según criterios morfológicos.. 41

Figura 7. Clasificación de espermatozoides según el grado de fragmentación del ADN mediante la técnica SCD con el Kit Canfrang de Candore..... 43

Figura 8. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la concentración espermática en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. 46

Figura 9. Efectos de *Laccopetalum giganteum* sobre la motilidad progresiva de espermatozoides de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. 48

Figura 10. Efectos de *Laccopetalum giganteum* sobre la motilidad no progresiva de espermatozoides de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida.. 49

Figura 11. Efectos de *Laccopetalum giganteum* sobre los espermatozoides inmóviles de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida..... 51

Figura 12. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la vitalidad espermática de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida.. 52

Figura 13. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la morfología normal espermática de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. 56

Figura 14. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la distribución de halos

espermáticos (SCD) de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida 54

Figura 15. Índice de fragmentación de ADN en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida y *Laccopetalum giganteum*. 57

RESUMEN

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial, y por eso, actualmente los tratamientos oncológicos están en constante desarrollo e innovación científica. Esto ha generado el incremento de supervivientes que han sido diagnosticados y tratados con dicha enfermedad; sin embargo, estos tratamientos pueden generar efectos secundarios críticos debido a su acción gonadotóxica. Las secuelas suelen implicar afecciones en el potencial reproductivo; por consiguiente hoy en día existe una constante búsqueda en preservar o recuperar la fertilidad en dicho contexto.

Por ello, el presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto del extracto liofilizado de flores *Laccopetalum giganteum* "pacra-pacra" sobre la calidad espermática en *Mus musculus* sanos que preliminarmente recibieron una dosis única de ciclofosfamida. Para este proyecto se utilizaron 25 ratones BALB/c que fueron divididos en cinco grupos: Control sano, Control ciclofosfamida y tres grupos experimentales tratados con una dosis de ciclofosfamida y 3 dosis del liofilizado durante 35 días (150, 300 y 450 mg/kg). Se evaluaron los principales parámetros espermáticos: motilidad, vitalidad, morfología y fragmentación de ADN. Al finalizar, los resultados evidenciaron que la concentración espermática, vitalidad y el índice de fragmentación de ADN pueden mejorar significativamente en aquellos grupos que fueron tratados con *Laccopetalum giganteum*.

Por lo tanto, se puede decir que el extracto liofilizado de flores de *Laccopetalum giganteum* tiene un efecto reparador sobre la calidad espermática en modelos murinos que previamente fueron expuestos a ciclofosfamida, actuando así como alternativa en la oncofertilidad.

PALABRAS CLAVE: Oncofertilidad, Ciclofosfamida, *Laccopetalum giganteum*, Ensayo SCD, Calidad espermática, *Mus musculus*, fertilidad masculina.

ABSTRACT

Cancer is a global public health issue; consequently, oncological treatments are currently undergoing constant development and scientific innovation. This has led to an increase in the number of survivors diagnosed and treated for this disease. However, these treatments can produce critical side effects due to their gonadotoxic action. Since the sequelae often involve impairments to reproductive potential, there is a continuous search today for ways to preserve or restore fertility in this context.

Therefore, the present study aims to evaluate the effect of the lyophilized extract of *Laccopetalum giganteum* flowers ("pacra-pacra") on sperm quality in healthy *Mus musculus* that previously received a single dose of cyclophosphamide. For this project, 25 BALB/c mice were used and divided into five groups: negative control, positive control, and three experimental groups treated with a dose of cyclophosphamide and three doses of the lyophilisate over 35 days (150, 300, and 450 mg/kg). The main sperm parameters were evaluated: motility, vitality, morphology, and DNA fragmentation. Ultimately, the results showed that sperm concentration, vitality, and the DNA fragmentation index can improve significantly in the groups treated with *Laccopetalum giganteum*.

In conclusion, it can be stated that the lyophilized extract of *Laccopetalum giganteum* flowers has a restorative effect on sperm quality in murine models previously exposed to cyclophosphamide, thus acting as an alternative in the field of oncofertility.

KEYWORDS: Oncofertility, Cyclophosphamide, *Laccopetalum giganteum*, SCD assay, sperm quality, *Mus musculus*, male fertili

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un problema de salud pública a nivel mundial a tal punto que en el año 2019 fue considerado por el Organismo Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales causas de muerte en personas menores a 70 años. Esta institución mostró que dicha patología puede ser tan agresiva fue la primera o segunda causa de los fallecimientos en muchas regiones de América.

Continuando con la línea del tiempo, en el año 2020 la plataforma "Global Cancer Observatory" (GLOBOCAN) reveló que hubo un total de 19.3 millones de casos nuevos de cáncer, de los cuales sorprendentemente cerca de 10 millones de las personas que fueron afectadas murieron, y proyectaron que en los próximos 17 años habría un total de 28.4 millones de personas afectadas (Sung *et al*., 2021).

Actualmente, los tratamientos usados para afrontar esta patología suelen afectar el funcionamiento fisiológico debido a que generan citotoxicidad en aquellas células que tienen una alta actividad mitótica (Anand *et al*., 2022); sin embargo, los agentes quimioterapéuticos también pueden afectar a las células germinales que se encuentran en meiosis ya que pueden generar daño a nivel del ADN y estimular la cascada de muerte celular programada (Ghafouri-Fard *et al*., 2021). Asimismo, se sabe que los pacientes que reciben tratamientos oncológicos presentan daños colaterales a nivel reproductivos como la infertilidad (Anand *et al*., 2022), lo cual ha sido demostrado en humanos y modelos animales como ratones (Morris, 2002). Es por ello, que preservar la fertilidad en pacientes luego de un tratamiento oncológico se ha convertido en una necesidad.

A pesar de los efectos secundarios, el desarrollo y la mejora de medicamentos anticancerígenos han permitido incrementar el número de sobrevivientes (Anand *et al*., 2022); sin embargo, debido a las secuelas es crucial buscar estrategias y alternativas para preservar la salud reproductiva masculina; las cuales actualmente son opciones limitadas y se basan en las técnicas de criopreservación de esperma o extracción,

aspiración o biopsia testicular (Woodruff, 2015). No obstante, de forma complementaria a las técnicas convencionales se ha visto en diferentes estudios que algunas plantas pueden contrarrestar los efectos negativos de dichos tratamientos, por ejemplo en Camerún se vio que el uso de *Helichrysum odoratissimum* “siempreviva” permite prevenir el daño reproductivo en pacientes (Watcho *et al*., 2019). Así mismo, la flora del Perú ha demostrado ser promisoria para preservar la fertilidad en pacientes sometidos a tratamientos oncológicos como el uso de *Uncaria tomentosa* “uña de gato” (Pino *et al*., 2009; Pino *et al*., 2024).

Por otro lado, según los datos almacenados en GLOBOCAN (2020), el Perú estuvo en el quinto lugar, a nivel de Sudamérica en incidencia, de hombres menores a 39 años que padecen cáncer. Además, este centro logró determinar que para los peruanos el riesgo acumulado de desarrollar cáncer para una persona menor o igual a 74 años es de 17.02% (Revilla, 2022).

Por consiguiente, es importante y necesario desarrollar una estrategia para optimizar la calidad espermática después de un tratamiento oncológico, ello a fin de favorecer la capacidad reproductiva del paciente y los resultados de las técnicas de fertilización *in vitro.* Para ello se plantea que la calidad espermática de ratones sometidos a un tratamiento antineoplásico con ciclofosfamida podría ser mejorada con el extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum de la familia Ranunculaceae, nombre vulgar “pacra pacra”*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Oncofertilidad

El cáncer, actualmente, es una enfermedad que no discrimina a la persona por sexo, raza o edad y según la OMS es un problema de salud pública que tiene un impacto económico sustancial, llegando a tal punto que en el año 2018 fue considerado como la segunda causa de muerte a nivel mundial. La OMS cuenta con la plataforma Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) que se encarga de recolectar y analizar continuamente datos epidemiológicos respecto a esta enfermedad; en ella se muestra que en el año 2022 el cáncer que tuvo mayor incidencia en varones peruanos fue el cáncer de próstata, el cual se proyecta que para el año 2030 se presente aproximadamente 380 nuevos casos por cada 100000 hombres con una mortalidad baja, aproximadamente del 8%.

El cáncer se origina a partir de una proliferación celular descontrolada, debido a que los mecanismos de regulación a nivel genético-celular tienen modificaciones en características y procesos que pueden ser compartidos o únicos, dando así origen a más de 100 tipos de cáncer (National Institutes of Health (US) *et al.*, 2007). Es por ello que los fármacos desarrollados para combatir este tipo de patologías actúan sobre la fase del ciclo celular o los mecanismos de control de proliferación celular (del Río, 2006).

Los tratamientos oncológicos dependen del diagnóstico y pueden ser clínicos como cirugía, quimioterapia y radioterapia, de igual forma cabe mencionar que estos recursos asombrosamente permiten salvar vidas debido a que están en constante desarrollo (Gupta *et al.*, 2023); sin embargo, se ha evidenciado que los medicamentos implicados en las terapias oncológicas pueden tener daños colaterales como poner en riesgo la fertilidad de los pacientes, debido a que algunos pueden ser gonadotóxicos (Hyman & Tulandi, 2013).

Debido a que la tasa de supervivencia de pacientes oncológicos que se encuentran en

edad reproductiva ha incrementado, se ha generado una necesidad y con ella un nuevo campo que es la intersección entre la medicina reproductiva y la oncología: oncofertilidad (Rashidian, 2024).

Según GLOBOCAN, el cáncer en Perú en el año 2022, tiene un panorama variado en la población masculina de 0 a 54 años. La base de datos muestra que para los peruanos la leucemia presenta las tasas más altas en incidencia y mortalidad, después sigue el cáncer testicular y los linfomas no Hodgkin que tienen una incidencia y mortalidad menor. En contraste, en la población peruana existen otros tipos de cánceres como por ejemplo el de estómago, pulmón, sistema nervioso central, próstata, tiroides y riñón que tienen un comportamientos distinto. (Figura 1).

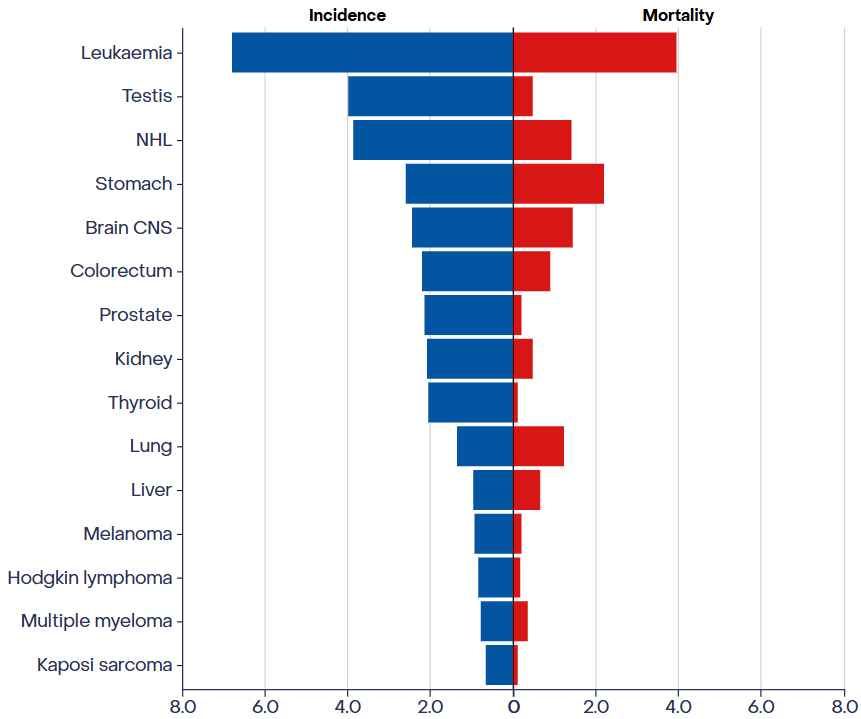


Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer en la población peruana masculina de 0 a 54 años (Tomado de Cancer Today, GLOBOCAN, 2022).

Según Gupta *et al.,*(2023), la Oncofertilidad brinda principalmente 3 alternativas para los varones que tienen como objetivo cuidar su salud reproductiva antes de un

tratamiento oncológico: Congelación del eyaculado seminal, congelación de espermatozoides obtenidos por recuperación quirúrgica y criopreservación de tejido testicular. La estrategia a utilizar se determina en función a la etapa de la pubertad ya que los pacientes prepúberes no pueden producir ni eyacular espermatozoides por lo que se les sugiere ir por la criopreservación de tejido testicular y, una vez superada la enfermedad, la posibilidad de someterse a varios procedimientos de trasplante para formar espermatozoides maduros que pueda ser usado en un procedimiento de alta complejidad de reproducción asistida; sin embargo, la Oncofertilidad aún presenta dilemas cómo la limitada asesoría de fertilidad en centros oncológicos, ya que se ha visto que solo el 50% de oncólogos recomiendan en consulta la criopreservación de semen a pesar de que más del 90% de ellos mencionan que deberían sugerirse a casi todos los pacientes, dicho problema se ve potenciado al notar en encuestas que al menos el 80% de los pacientes sobrevivientes a tratamientos cancerígenos buscan la paternidad después de su tratamiento, lo que resalta la urgencia de integrar las necesidades psicosociales de los sobrevivientes de cáncer en los programas de preservación de la fertilidad (Gupta *et al.*, 2023).

2.2. Ciclofosfamida

La ciclofosfamida (Cy) fue sintetizada en el año 1958 y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó su uso en el año 1959 como un fármaco con actividad anticancerígena que, actualmente, se emplea para tratar diversas neoplasias malignas sólidas, hematológicas e infantiles, como el linfoma de Hodgkin, el mieloma múltiple, la leucemia mieloide crónica, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón microcítico, el cáncer de útero, el linfoma de Burkitt, el neuroblastoma y el cáncer de endometrio. Asimismo, la Cy se utiliza en patologías no oncológicas, como la esclerosis múltiple y trastornos renales, entre ellos la glomerulonefritis focal y segmentaria y el síndrome nefrótico refractario al tratamiento con corticosteroides (Dabbish *et al.,* 2024).

La ciclofosfamida es un fármaco que se metaboliza principalmente en el hígado a través de la enzima citocromo P450, generando diversos metabolitos de los cuales el 4-hidroxi-ciclofosfamida (4-OH-Cy) es el predominante y activo; no obstante, también se generan los metabolitos terminales citotóxicos, de los cuales destacan la mostaza de fosforamida (PM) y acroleína. La PM, al liberarse, alquila la base guanina del ADN del anillo de imidazol y esto promueve la formación de enlaces cruzados intracatenarios guanina-adenina,conduce a la activación de procesos apoptóticos celulares (El-Serafi & Steele, 2024).

Cy puede administrarse por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, oral, intrapleural o por perfusión; ello permite definir la concentración de las dosis, por ejemplo por vía intravenosas pueden ser de 40-50 mg/kg durante dos a cinco días en dosis divididas, por vía oral puede ser de 1 a 5 mg/kg (Olowe *et al.*, 2024).

A lo largo de los años, se realizaron diversos estudios experimentales que han buscado comprender cómo la ciclofosfamida afecta la fertilidad femenina y masculina, logrando demostrar que el impacto negativo está asociado con la concentración-dosis-duración del tratamiento, concluyendo además que existe una correlación directa con el daño ovárico en hembras y el alto riesgo de infertilidad en machos (Shiromizu *et al*., 1984; Kenney *et al*., 2001; Koike *et al*., 2018).

En el caso masculino, las alteraciones en muestras espermáticas se deben principalmente a que acroleína y la mostaza fosforamida forman aductos con el ADN e inhiben su transcripción y replicación, encontrando además una pérdida de células espermatogoniales y un incremento en las rupturas de doble cadena del ADN (Koike *et al*., 2018). De igual forma, este mecanismo también afecta a las células de Leydig y altera su capacidad de transcripción con lo que, naturalmente, se ve una reducción de la concentración de la testosterona a nivel sérico, afectando también la regulación del eje hipotálamo - hipófisis - gónada; ello contribuye a que la calidad espermática se vea mermada (Díaz *et al*., 2006; Olowe *et al.*, 2024),

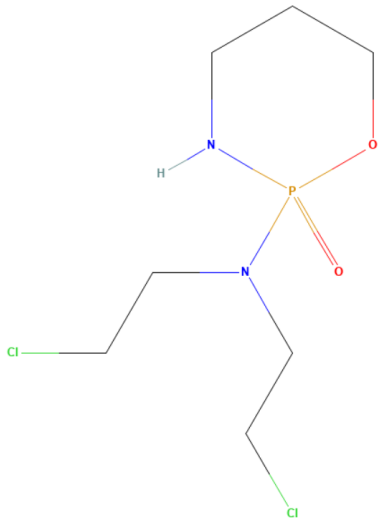


Figura 2. Estructura química de la ciclofosfamida en 2D.

Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). PubChem Compound Summary for CID 2907, Cyclophosphamide. Consulta: 25 de enero de 2026 (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyclophosphamide#section=2D-Structure).

2.3. Espermatogénesis

La espermatogénesis ocurre dentro del epitelio seminífero y se da gracias al apoyo de un conjunto de células somáticas como las de Sertoli y Leydig, además es un proceso biológico altamente complejo, mediante el cual a partir de células diploides indiferenciadas se originan células especializadas haploides denominadas espermatozoides; este proceso ocurre en 3 etapas principales: mitosis de las espermatogonias, meiosis de los espermatocitos y espermiogénesis de las espermátidas, estas etapas son fundamentales ya que alguna perturbación puede impactar negativamente en el potencial reproductivo del individuo (Zhang *et al*., 2024).

Como se muestra en la Figura 3, la etapa de mitosis en la espermatogénesis permite la renovación de la población de células madre espermatogoniales y la obtención de

espermatogonias que puedan participar en la vía de diferenciación espermatogénica; ello debido a que la etapa de mitosis da como resultado el origen de dos subpoblaciones principales. Una de las espermatogonias se denomina tipo A y está encargada de mantener la población celular; mientras que las espermatogonias de tipo B, participan activamente en el proceso de diferenciación. Continuando con el proceso de espermatogénesis en la etapa de meiosis se busca reducir la carga genética, es decir pasar de una célula diploide a una haploide, lo cual se logra a través de divisiones celulares sucesivas. Esta etapa se inicia cuando una espermatogonia tipo B pierde el contacto con la membrana basal y da origen a un espermatocitos primario, quien al terminar la meiosis da origen a 4 espermátides haploides que pasarán por un proceso de diferenciación denominado espermiogénesis, el cual termina con la espermiación, en donde ocurre una transformación morfológica progresiva de una célula redonda sin flagelo a un espermatozoide; para que ello ocurra se requiere una serie de pasos que consisten en la formación del acrosoma, cambios en la condensación y reorganización nuclear, el desarrollo del flagelo o cola del espermatozoide, la reorganización del citoplasma y de orgánulos celulares, y el proceso de liberación de la célula de Sertoli hacia la luz del túbulo seminífero (O'Donnell & Smith, 2000).

Finalmente, cabe señalar que el tiempo requerido para completar este proceso depende de la especie, por ejemplo, en el ratón se requiere aproximadamente 4 ciclos que duran cerca de 35 días (Griswold, 2022).

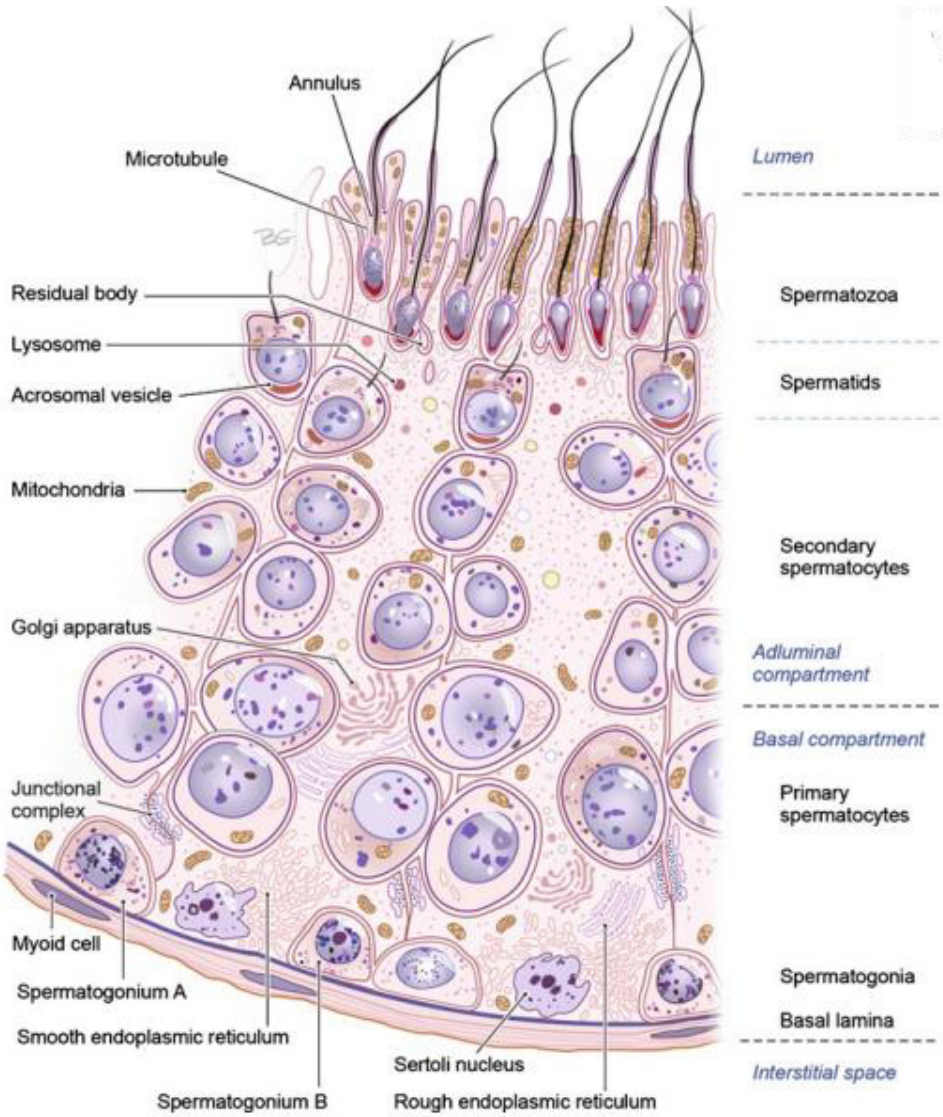


Figura 3. Esquema de la organización del epitelio germinal dentro del túbulo seminífero. Se observa cómo las células de Sertoli permiten delimitar la barrera hematotesticular formando los compartimentos basal y adluminal. Esto permite que se de la espermatogénesis y la espermiación hacia la luz del túbulo seminífero. Imagen adaptada de Cleveland Clinic Center for Medical Art & Photography © 2010.

2.4. Estrés oxidativo y fragmentación de ADN espermático

La fragmentación de ADN puede entenderse como el daño en el material genético de

una célula, el cual puede afectar su correcto funcionamiento. En este caso, los espermatozoides con fragmentación en el ADN pueden fertilizar a un óvulo y obtener un embrión viable gracias a la capacidad reparadora del ovocito; sin embargo, se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* que aquellos embriones que superan un umbral crítico de daño tienden a detener su desarrollo (Sakkas & Álvarez, 2010).

Según González-Marín *et al.,* (2012), las causas de fragmentación de ADN pueden agruparse en dos categorías: intrínsecas y extrínsecas. Una de las razones intrínsecas son los errores en la recombinación durante la espermatogénesis, los cuales pueden verse favorecidos por la estructura del ADN espermático, ya que éste cuenta con protaminas que tienden a compactarse más que las histonas, lo que promueve la formación de enlaces cruzados ADN-ADN o ADN-proteína, favoreciendo procesos que pueden culminar en apoptosis celular; otra razón corresponde a la maduración errónea de las espermátidas, ya que para poder madurar nuclearmente se reemplazan entre el 85% y 95% de histonas por protaminas; sin embargo, en dicho proceso es necesario cortar segmentos de ADN para poder liberar la tensión torsional y reemplazar por proteínas de transición que posteriormente serán sustituidas por las protaminas de tipo 1 y 2 (P1 y P2). En condiciones normales, se espera que al finalizar este proceso la proporción de P1 y P2 sea cercana a 1:1 y que las roturas transitorias del ADN sean reparadas adecuadamente; no obstante, cuando este mecanismo falla, puede generarse fragmentación del ADN en los espermatozoides eyaculados. Asimismo, se ha visto que de forma intrínseca están vinculados a la vía de apoptosis y el estrés oxidativo, ya que los espermatozoides pueden activar la vía de apoptosis por rupturas de doble cadena; sin embargo, se ha visto que los espermatozoides a pesar de ello pueden terminar su proceso de maduración e incluso fertilizar, lo que contribuye a comprender por qué cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS) superan a los antioxidantes y dañan la estructura celular y el ADN aún pueden encontrarse dentro del eyaculado. En cuanto a las razones extrínsecas, estas podrían deberse a

patologías como varicocele, infecciones bacterianas, edad, reacción a procedimientos médicos como quimioterapia, temperatura testicular y toxicidad ambiental.

Actualmente, para poder cuantificar la fragmentación de ADN existen diversas técnicas, como la prueba de TUNEL que se fundamenta en el marcaje de los extremos libres 3'-OH del ADN bicatenario mediante la acción de la enzima TdT, lo que permite la detección directa de espermatozoides con ADN fragmentado. Este procedimiento identifica las roturas del ADN a través de la incorporación de nucleótidos, generalmente desoxiuridina trifosfato (dUTP), catalizada por la ADN polimerasa terminal TdT, mientras que el ensayo de estructura de la cromatina espermática (SCSA) evalúa la susceptibilidad de la cromatina a la desnaturalización, principalmente asociada a roturas de doble cadena, requiriendo citometría de flujo. Por otro lado, la prueba de dispersión de la cromatina espermática (SCD) se basa en la ausencia de dispersión de la cromatina en espermatozoides con ADN fragmentado y destaca por su bajo costo y facilidad de uso, aunque presenta variabilidad interobservador. El ensayo Cometa, en sus variantes alcalina y neutra, permite evaluar roturas de cadena simple y doble a nivel unicelular mediante electroforesis, siendo sensible incluso con recuentos bajos de espermatozoides, aunque carece de estandarización. Finalmente, el Cometa de dos colas (2T-Comet) permite diferenciar simultáneamente ambos tipos de roturas, pero requiere alta experiencia técnica y no cuenta aún con protocolos estandarizados (Adler *et al.*, 2023)

El ensayo de SCD no requiere equipos complejos, ya que en una lámina los espermatozoides son colocados en una matriz de agarosa de bajo punto de fusión, para luego exponerse a una solución ácida que permitirá desnaturalizar el ADN, el cual podrá ser liberado después de un tratamiento con una solución de lisis que eliminará los puente disulfuro de las proteínas nucleares; todo ello permitirá formar bucles de ADN dentro de la matriz inerte, los cuales se verán como un halo (Fernández *et al.*, 2018). Se ha visto que la técnica de SCD permite evaluar la integridad del ADN

espermático a través de la lectura del tamaño de los halos, convencionalmente en los kits para humanos los espermatozoides que cuentan halos grandes y medianos son considerados como aquellos que no tienen el ADN fragmentado, a diferencia de los que tienen halo pequeño o sin halo (Ragosta *et al.*, 2024). Esta técnica en ratones es muy utilizada a nivel de investigación y la interpretación de los resultados sigue los mismos lineamientos mencionados, lo cual se puede apreciar en la Figura 4 (Mehraban *et al.,* 2021; Timar *et al.,* 2022).

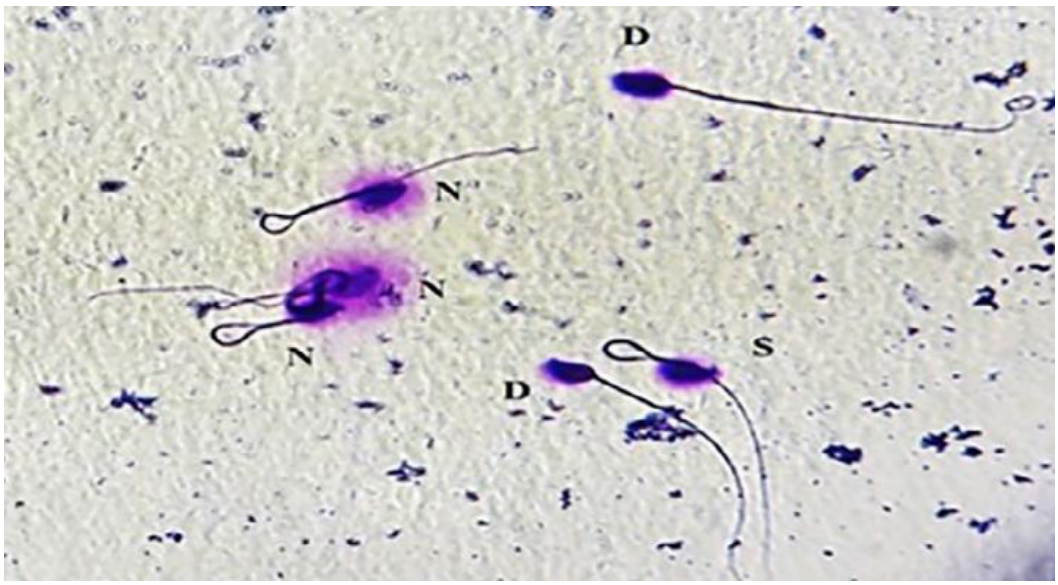


Figura 4. Fragmentación del ADN espermático en ratones mediante la técnica de SCD. Los espermatozoides con ADN no fragmentado presentan halos grandes o medianos de cromatina dispersa alrededor de un núcleo compacto (N), mientras que aquellos con ADN fragmentado muestran halos pequeños (S) o ausencia de halo (D). 40X. Imagen tomada de Timar *et al.,* (2022).

2.5. Fitoterapia en oncofertilidad

Los tratamientos más utilizados en la actualidad a nivel oncológico son la radioterapia y la quimioterapia; sin embargo, a menudo suelen generar diversos efectos adversos que pueden mermar su aplicación clínica ya que pueden reducir la calidad de vida de los pacientes a corto y largo plazo, siendo el impacto negativo a nivel reproductivo el

que más destaca y preocupa.

Por otra parte, hay estudios que han mostrado que existen plantas que pueden prevenir el cáncer e incluso mitigar algunos de los efectos secundarios de estas terapias. Esto se debe a que sus componentes bioactivos han demostrado ser útiles. Por ejemplo, algunos metabolitos han demostrado que pueden reducir la mucositis oral, la toxicidad gastrointestinal, la hepatotoxicidad, la nefrotoxicidad, la lesión del sistema hematopoyético, la cardiotoxicidad y la neurotoxicidad. No obstante, aún se requiere profundizar en los estudios en este rubro para estandarizar su uso (Zhang *et al.*, 2018).

Se ha determinado, en general, que las plantas utilizadas durante un tratamiento oncológico pueden mitigar la toxicidad gastrointestinal, prevenir la hepatotoxicidad, aliviar la nefrotoxicidad, reducir las lesiones a nivel hematopoyético y cardiotoxicidad; ello debido a la actividad antioxidante y antiinflamatoria de sus componentes bioactivos (Zhang *et al.*, 2018).

Por otro lado, a nivel reproductivo, se ha observado que algunas de ellas como *Brillantaisia patula* pueden preservar la función ovárica en ratas después de una exposición a ciclofosfamida ya que es capaz de mitigar el estrés oxidativo a través de su actividad como antioxidante, restablecer los niveles hormonales y permitir obtener mejores resultados reproductivos (Ogunro & Ofeniforo, 2024). En cuanto al enfoque masculino, se ha reportado en modelo murinos que las plantas como *Curcuma longa*, a través de curcumina, logran reducir el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica y el daño oxidativo del ADN (Simón & Mariotti-Celis, 2024), asimismo, se ha evidenciado en este mismo modelo biológico que plantas como *Myrciaria dubia* en extractos acuoso pueden reducir el impacto de medicamentos como la ciclofosfamida al proteger la integridad del ADN espermático; ello debido a su actividad como antioxidante que reduce los radicales libres generados por dicho medicamento (Pino *et al.,* 2024).

Laccopetalum giganteum (Wedd.) Ulbrich (Ranunculaceae), llamada también Huamanripa, pacra, pacra pacra, flor de guarmayta es una hierba andina que crece

entre los 4000-4750 m (Bussmann & Sharon, 2018), es una planta endémica del Perú, distribuido en los departamentos de Huánuco, Junín, Huancavelica y La Libertad (León, 2006). Es una planta medicinal con propiedades curativas para tratar la tos, bronquitis, asma, gripe, reumatismo, epilepsia, fertilizacion de mujeres (Bussmann & Sharon, 2018) y antiinflamatorio (Vasquez, 2020); Arroyo *et al.,* (2007) encontró que el extracto etanólico de las flores de *L, giganteum* incrementó en ratas hembras la fertilidad, sugiriendo este efecto, a la presencia de flavonoides, taninos y compuestos fenólicos que incrementaron la presencia de FSH en hembras y testosterona en machos. Ruíz y Mejia (2020) hallaron que las flores de *L. giganteum* tenían una gran cantidad de alcaloides, azúcares, glucósidos, esteroides y tripertenos; así como una menor cantidad de flavonoides y regular cantidad de taninos, compuestos fenolicos y quinonas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

- La administración del extracto liofilizado de las flores de *Laccopetalum giganteum* "pacra-pacra" puede recuperar la calidad espermática de ratones machos sometidos a un tratamiento antineoplásico con ciclofosfamida.

3.2. Objetivos

2.3.2.1. Objetivo General:

- Evaluar el efecto del extracto liofilizado de las flores de *Laccopetalum giganteum* como un tratamiento alternativo para la regeneración de la calidad espermática en *Mus musculus* después de ser sometidos a un tratamiento antineoplásico con ciclofosfamida.

2.3.2.2. Objetivos Específicos:

- Estimar los parámetros microscópicos del espermograma (concentración, movilidad, vitalidad y morfología) de ratones sometidos a tratamientos con extracto liofilizado de flores de *Laccopetalum giganteum* tras someterse a un tratamiento oncológico.

- Determinar el índice de fragmentación de ADN y la distribución de halo obtenido por SCD de los ratones sometidos a tratamientos con extracto liofilizado de flores de *Laccopetalum giganteum* luego de someterse a un tratamiento oncológico.

- Comparar los parámetros espermáticos y el índice de fragmentación del ADN espermático entre un grupo control sano, un grupo tratado únicamente con ciclofosfamida y grupos tratados con ciclofosfamida más extracto liofilizado de flores de *Laccopetalum giganteum* ("pacra pacra") en dosis de 150, 300 y 450 mg/kg.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Material Biológico

4.1.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c de 8 a 9 semanas de edad con un peso promedio de 28 gramos; los cuales fueron obtenidos en el Instituto Nacional de Salud (INS), Lima, Perú. Estos animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM bajo condiciones estándar: 14 horas de luz/10 horas de oscuridad, temperatura de 22 $\pm$ 2 °C, humedad relativa (HR) de 85%, comida y agua *ad libitum*. Estas consideraciones están basadas en las normas de bioética establecidas por diversos comités de ética (FONDECYT – CONICYT, 2009; Fuentes Paredes *et al.*, 2008) y normas sobre la ética en la investigación MINSA (2011).

4.1.2. Obtención de Laccopetalum giganteum

Las plantas y flores de *Laccopetalum giganteum* fueron recolectadas del distrito de Conchucos, de la provincia de Pallasca, departamento de Ancash. La colecta se realizó durante las horas del día y con luz solar presente, ya que la zona geográfica es de difícil accesibilidad. Posteriormente, los ejemplares con estructuras completas fueron remitidos para su adecuada identificación taxonómica en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

4.1.3. Materiales de laboratorio

4.1.3.1. Equipos

- Balanza analítica de 0,0001 gr (Boeco)
- Microscopio óptico binocular de campo claro con cámara incorporada (Nikon)
- Incubadora de aire seco (Forma Scientific)

- Plancha secadora de láminas (Chicago Surgical y Electrical Co)
- Refrigeradora doméstica (Oster)

4.1.3.2. Insumos

- Láminas portaobjetos
- Laminillas cubreobjetos (22x60)
- Placas Petri
- Tubos Eppendorf de 2 mL
- Papel lente
- Jeringas de tuberculina
- Tips para micropipetas
- Guantes de nitrilo talla S
- Estuche de disección
- Micropipeta multivolumenes: 10 uL-100 uL y 100 uL - 1000 uL
- Copas de coloración (vasos Couplin) de 50 mL
- Jaula de alojamiento animal
- Bebederos de plástico
- Cámara de newbauer
- Sonda orogástrica # 20 de acero inoxidable

4.1.3.3. Reactivos, medios y soluciones

- Global® Total® with HEPES (Coopersurgical)
- Solución de eosina Y 0.5% (Sigma)
- Hematoxilina de Harris (Sigma)
- Solución Wright 5% (Sigma)
- Kit de fragmentación de ADN espermático - CANfrag (Candore)
- Alcohol de 70°, 90° y 100°

- Ciclofosfamida Solución Inyectable 200 mg (PERU LAB)

4.2. Diseño Experimental

4.2.1. Tamaño muestral y grupos de tratamiento

Se trabajó con 25 ratones *Mus musculus* de la cepa BALB/c, procedentes del Instituto Nacional de Salud del Perú (INS), los cuales se dividieron en cinco grupos experimentales, n = 5 por grupo.

- Control sano: Ratones sanos dosificados únicamente con suero fisiológico.
- Control ciclofosfamida: Ratones sanos tratados con una dosis de 120 mg/kg del agente antineoplásico, ciclofosfamida.
- 3 dosis experimentales de *Laccopetallum giganteum*: Ratones sanos tratados con ciclofosfamida (120 mg/kg) que posteriormente fueron dosificados con el extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum* resuspendido en suero fisiológico en tres concentraciones: 150 mg/kg, 300 mg/kg y 450 mg/kg.

4.2.2. Liofilización de Laccopetalum giganteum

El liofilizado se realizó a través de la empresa HARO'S, la cual empleó una liofilizadora Virtis con capacidad de 6 kg, modelo Consol 12, serie 158.

Las flores de *Laccopetalum giganteum* seleccionadas previamente a su procesamiento fueron lavadas y desinfectadas. Posteriormente, se cortaron y organizaron en 2 bandejas de acero inoxidable (4 x 30 × 75 cm) con papel platino, 400 gramos en cada una. Finalmente, antes de iniciar el proceso se colocó un sensor de temperatura (PT100) en el centro de cada bandeja para el monitoreo de la muestra durante todo el ciclo de liofilización que duró 56 horas. A continuación se detalla ciclo por ciclo.

Tabla 1. Etapas y variables del ciclo de liofilización de flores de *Laccopetalum giganteum.*

Etapas	Rango de temperatura (°C)	Temperatura de seteo (°C)	Vacío	Tiempo (Horas)
Congelamiento	25 °C a − 40 °C	-40	-	8
Secado primario (Sublimación)	−40 °C a 0 °C	-17	50 MILITOR	8
		7°C	50 MILITOR	8
		0°C	50 MILITOR	8
Secado secundario (Desorción)	0°C a 39°C	15°C	50 MILITOR	8
		25°C	50 MILITOR	8
		39°C	50 MILITOR	8
Tiempo total del proceso				56



Figura 5. Preparación del material vegetal, flores de Laccopetalum giganteum, para el proceso de liofilización. (A) Flor íntegra tras la selección y limpieza. (B) Material vegetal fraccionado y dispuesto uniformemente en bandeja para liofilización.

4.2.3. Determinación, preparación y frecuencia de la dosis de exposición

La dosis usada de ciclofosfamida y del extracto liofilizado resuspendido en suero fisiológico de las flores de *Laccopetalum giganteum* se estableció en función del peso corporal de cada ratón, esta fue expresada en miligramos por kilogramo (mg/kg).

Para la aplicación de los tratamientos los individuos fueron pesados inmediatamente antes de su aplicación. La ciclofosfamida fue administrada por vía intraperitoneal, mientras que el extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum* fue por vía oral mediante gavage (sonda orogástrica).

La dosis de ciclofosfamida aplicada fue de 120 mg/kg y se determinó en base a antecedentes bibliográficos y experimentales en donde se determinó que valores por encima de 100mg/kg son tóxicos, mientras que dosis mayores a 200 mg/kg durante 35 días genera infertilidad (Kanno *et al.*, 2009). Asimismo, de manera preliminar se ejecutó un estudio piloto donde se usó una dosis de 160 mg/kg durante el periodo mencionado y los resultados mostraron que la dosis generaba mortalidad del 75%, lo cual comprometía la viabilidad del diseño experimental. En función de estos hallazgos se seleccionó la dosis de 120 mg/kg, ya que permitió obtener un daño controlado a nivel reproductivo masculino en ratones sin comprometer su supervivencia. Esta dosis se administró de forma única y fue considerada como el día 0 del cronograma experimental.

En cuanto a las dosis seleccionadas del extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum* se determinó en función al estudio realizado por Arroyo *et al.,* (2007), quien evidenció que al suministrar un extracto hidroetanólico de dichas flores en concentraciones de 300 mg/kg en ratas machos se incrementó el nivel de testosterona. Con base en dicho artículo se determinó trabajar con 3 niveles de exposición: 150 mg/kg, 300 mg/kg y 450 mg/kg, las cuales fueron administradas de forma interdiaria por 35 días, la duración del

tratamiento se debe a que en los ratones se requiere aproximadamente cerca de dicha cantidad de días para la espermatogénesis (Griswold, 2022).

El medicamento de Ciclofosfamida en solución Inyectable (200 mg) fue disuelto en suero fisiológico estéril. Se preparó una solución madre y se usó 120 mg del medicamento, los cuales fueron resuspendidos en 10 mL de suero. Luego la solución preparada se transportó al bioterio en una caja de tecnopor con gelpacks para mantener la estabilidad del medicamento. Por su parte el extracto liofilizado se almacenó a -18°C hasta su uso en un recipiente estéril de vidrio de color ambar; para cada tratamiento se preparó una solución madre de 10 mL, para lo cual el extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum* se resuspendió en suero fisiológico esteril mediante agitación.

4.2.4. Obtención de espermatozoides de la cola de epidídimo

Al finalizar el periodo de exposición, los ratones se trasladaron al laboratorio y se procedió a la eutanasia por dislocación cervical. Se realizó una asepsia de la zona abdominal con alcohol de 70° y, mediante un corte con ayuda de una tijera estéril de punta fina se expuso la cavidad abdominal para identificar el aparato reproductor masculino del espécimen. Luego se extrajeron ambas gónadas (testículos), los dos epidídimos y las colas de los epidídimos.

Posteriormente, se disecó el epidídimo derecho para aislar la región de la cola, la cual fue sumergida y disgregada en un microtubo de 2.0 mL que contenía 1 mL de medio Global® Total® with HEPES a 37°C. La muestra se mantuvo incubando en una estufa a 37°C por 5 minutos para permitir la liberación de los espermatozoides.

4.2.5. Medición de parámetros espermáticos

Todos los parámetros espermáticos fueron analizados a partir de la suspensión obtenida tras la difusión y homogeneización de los fragmentos de la cola del epidídimo

en medio de Hepes. Para asegurar la estandarización de mediciones, el análisis se realizó en condiciones controladas de temperatura y tiempo; esto implicó trabajar con material de vidrio, plástico y medios.

La metodología usada para analizar cada ítem se basó en las recomendaciones del manual de la OMS (2021).

4.2.6. Concentración espermática

Inicialmente, se estimó la densidad de espermatozoides mediante la observación y conteo de un campo en el microscopio a un aumento total de 400X. Luego, en base al valor obtenido se realizaron las diluciones utilizando agua destilada como medio hipotónico que permitió inmovilizar a los espermatozoides; ello se realizó siguiendo lo establecido en la Tabla 2.

Posteriormente se cargó en la cámara de neubauer un volumen de 10 uL de la dilución obtenida en cada retículo de la cámara y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 5 minutos para que las células se sedimenten. Finalmente, el conteo de los espermatozoides se realizó en un microscopio de campo claro a un aumento total de 40X de la cámara de neubauer, se contaron las cuadrículas requeridas y los valores obtenidos se expresaron en millones de espermatozoides por mililitro ($\times 10^6$/mL).

Tabla 2. Diluciones recomendadas para el recuento de la concentración espermática según el Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen (OMS, 2021 quinta edición).

Espermatozoides por campo ×400	Dilución requerida
>101	1:20 (1 + 19)
16–100	1:5 (1 + 4)

2–15	1:2 (1 + 1)
<2	1:2 (1 + 1)

4.2.7. Movilidad o motilidad espermática

Para poder determinar este parámetro, se colocó un volumen de 10 uL de la suspensión inicial en un portaobjeto precalentado a 37°C. Se evaluaron un mínimo de 200 espermatozoides mediante microscopía óptica a un aumento total de 400x. Si bien el Manual de la OMS 2021 clasifica la motilidad espermática en cuatro categorías, en el presente estudio los espermatozoides progresivos rápidos y lentos fueron agrupados como motilidad progresiva total. Esta agrupación se realizó considerando que la diferenciación entre progresivos rápidos y lentos depende de la estimación de la velocidad espermática, la cual requiere un microscopio equipado con platina térmica o de temperatura controlada. Al no contar con esta condición durante toda la evaluación, se priorizó una clasificación que redujera la variabilidad asociada al análisis manual. Los valores finales fueron expresados en porcentajes.

- Motilidad no progresiva (MNP): Espermatozoides con movimientos que carecen de desplazamiento en el espacio; ellos pueden formar círculos pequeños e incluso no trasladarse y solo tener movimiento flagelar o cefálico.
- Inmóviles (I): Espermatozoides que presentan ausencia total de movimiento.

4.2.8. Vitalidad espermática

La evaluación de la vitalidad se determinó por la exclusión de un colorante vital; para ello se preparó una solución de eosina Y al 5% en medio HEPES, la cual fue calentada a 37°C previamente a su uso. Posteriormente, en una lámina precalentada se mezcló una alícuota de 10 uL de la suspensión espermática y 5 uL de la solución de eosina Y, esto se homogeneizó y sobre ello se colocó un cubreobjetos pre-calentado.

La evaluación se realizó en un microscopio de campo claro a un aumento total de 40x y se contaron 200 espermatozoides como mínimo, estos fueron clasificados en 2 categorías y se expresaron como el porcentaje (%) de espermatozoides vivos respecto al total contado.

- Vivos: Espermatozoides que cuentan con una membrana citoplasmática íntegra que evita el ingreso del colorante (permanecen incoloros).
- Muertos: Espermatozoides que permitieron el ingreso del colorante (teñidos de rojo-rosado) debido a la pérdida de la estabilidad y la permeabilidad selectiva de la membrana.

4.2.9. Morfología espermática

La evaluación de la morfología se realizó mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina; para ello, primero se realizó un frotis con un volumen de 10 uL de la muestra en suspensión de espermatozoides sobre una lámina portaobjetos y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, las células fueron fijadas por inmersión en alcohol de 97° por 15 min.

Las láminas se sumergieron en vasos coplin con hematoxilina por 5 minutos; tras un lavado rápido con agua corriente para retirar el excedente de colorante, se procedió a exponerlas en eosina Y por 5 min y para finalizar se lavó con agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente (Vieira *et al.*, 2024).

El análisis se realizó en un microscopio óptico de campo claro con un aumento total de 1000X utilizando aceite de inmersión. Se evaluaron las estructuras (cabeza, cuello y cola) siguiendo los criterios de Vieira *et al.,* (2024), en donde muestran estructuras normales y anormales que pueden presentar los espermatozoides de esta especie.

(Figura 6).

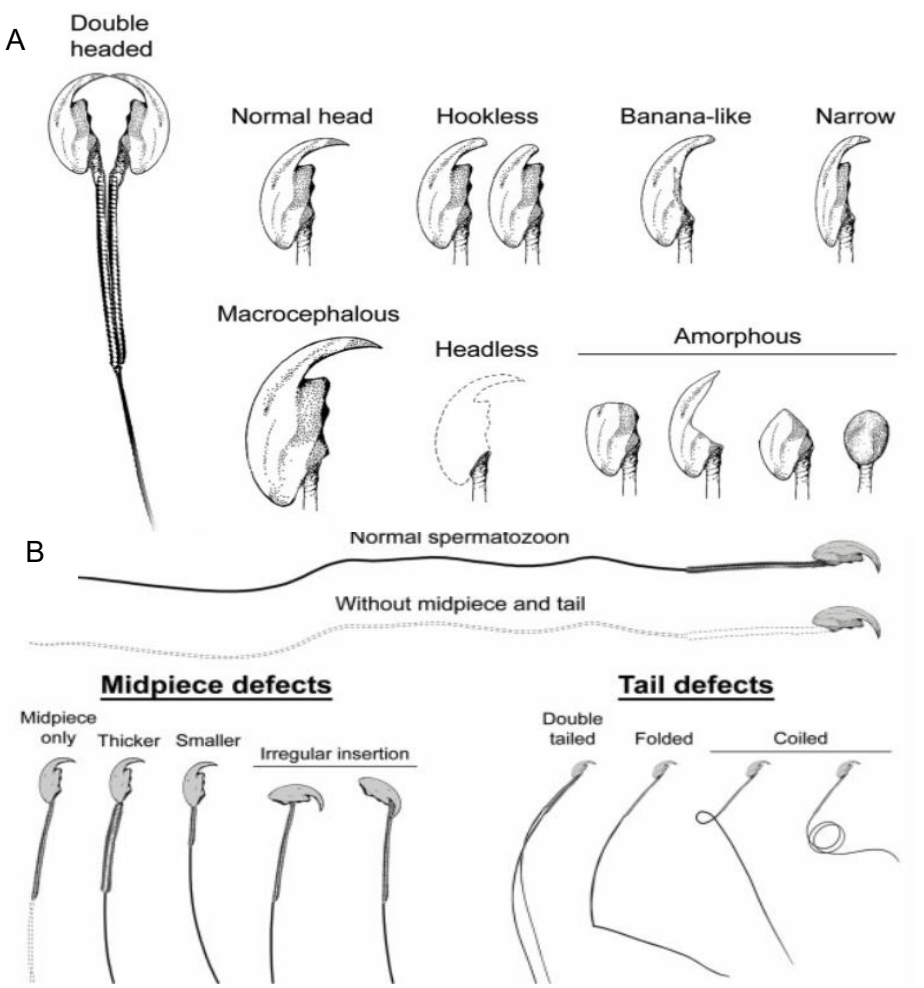


Figura 6. Representación esquemática de espermatozoides de ratón normales y anormales según criterios morfológicos. (A) Defectos morfológicos en la cabeza. (B) Defectos morfológicos en pieza media y cola. Adaptado de Vieira *et al.,* (2024).

4.2.10. Fragmentación de ADN espermático (SCD)

La evaluación de la fragmentación de ADN se realizó mediante la técnica de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD); para ello se estandarizó el kit comercial de Candore (diseñado originalmente para humanos), ajustando concentraciones y tiempos para su uso en muestra murinas con el objetivo de mantener el sistema de lectura, lo cual se ilustra en la figura 7. Se siguió el protocolo de Timar *et al.,* (2022).

- ADN no fragmentado: Espermatozoides con halo grande, mayor o igual al diámetro

de la cabeza del espermatozoide, o mediano, donde la dispersión del halo es mayor o igual a 1/3 del ancho de la cabeza pero menor al diámetro de la cabeza.

- ADN fragmentado: Espermatozoides con halo pequeño (dispersión menor a 1/3 del ancho de la cabeza), sin halo o en estado degradado.

En primer lugar se ajustó la concentración de la suspensión espermática a un valor menor o igual a 15 millones por mililitro. Posteriormente, se colocó 75 uL de agarosa de bajo punto de fusión en un baño maría a 90°C por 2 minutos y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos para estabilizar la temperatura. Luego, se mezclaron 10 uL de la muestra con la agarosa fundida, se homogeneizó y, de esta mezcla se tomaron 75 uL y se agregaron sobre la lámina recubierta con agarosa con punto de fusión normal. Se cubrió con una laminilla de 22x22 mm y se refrigeró a una temperatura de 4.5°C durante 5 minutos.

Tras retirar la laminilla delicadamente, se procedió a incubar la muestra por 5 minutos con el reactivo ácido diluido a la cuarta parte para la desnaturalización. Inmediatamente después, se descartó el reactivo y se agregó el medio de lisis por 8 minutos, para finalmente ser lavado con un volumen de 20 mL de agua destilada y ser deshidratado en una batería de alcoholes (70°, 90° y 100°) por 2 minutos en cada gradación.

Una vez que las láminas secaron a temperatura ambiente, se agregó el colorante de Wright por 11 minutos. El exceso de colorante fue escurrido y, tras el secado final, se contabilizó un mínimo de 500 espermatozoides mediante microscopía de campo claro a un aumento total de 400X. Los resultados obtenidos se expresaron como el Índice de Fragmentación de ADN (DFI) en porcentaje (%).

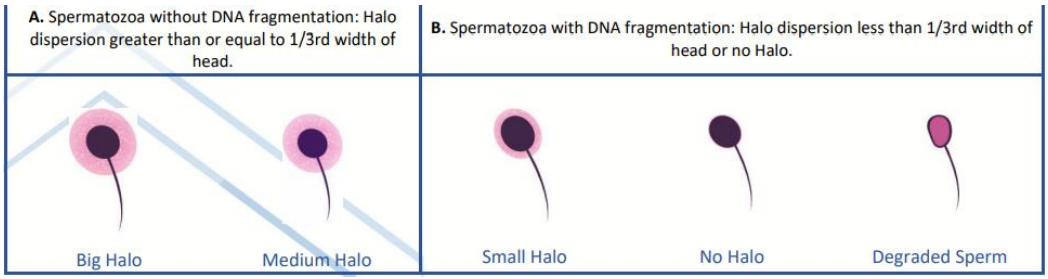


Figura 7. Clasificación de espermatozoides según el grado de fragmentación del ADN mediante la técnica SCD con el Kit Canfrang de Candore (A) Espermatozoides sin fragmentación de ADN, caracterizados por la presencia de un halo de dispersión mayor o igual a 1/3 del ancho de la cabeza. (B) Espermatozoides con fragmentación de ADN, con halo de dispersión menor a 1/3 del ancho de la cabeza o ausencia de halo. (Tomada del manual técnico del Kit Canfrag® SCD, Candore, 2022).

4.2.11. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este estudio para cada uno de los parámetros analizados fueron independientes y se organizaron en una hoja de cálculo y analizados en R en entorno online (RStudio Cloud / Posit Cloud).

En el entorno online se evaluó la naturaleza de los datos con el objetivo de categorizar si son o no paramétricos. Para ello se determinó los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. La normalidad de los datos se determinó a través de la prueba de Shapiro–Wilk y la homogeneidad de las varianzas se evaluó mediante la prueba de Levene.

Luego se realizó la comparación entre los grupos. Si los datos presentaban una distribución normal y homogeneidad de varianzas de los datos, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). En los casos en que se cumplió la normalidad pero no la homogeneidad de varianzas, se usó el ANOVA de Welch, seguido de la prueba post hoc de Games–Howell. Sin embargo, cuando los datos no cumplieron el supuesto de

normalidad, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, seguida de la prueba post hoc de Dunn con ajuste de Holm para comparaciones múltiples.

Finalmente, para los resultados de los datos paramétricos se expresaron como media ± desviación estándar, mientras que quienes no lo eran se mostraron como mediana. El tamaño del efecto se estimó mediante eta cuadrado (η^2) en los análisis de varianza, y se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Obtención de espermatozoides de la cola de epidídimo

La obtención de espermatozoides a partir de la cola de epidídimo fue exitosa en todos los animales experimentales. La cantidad recuperada fue suficiente en todos los casos para realizar los análisis mencionados. No se evidenció contaminación ni pérdidas durante el procedimiento.

5.2. Medición de parámetros espermáticos

La evaluación de los parámetros espermáticos incluyó el análisis de concentración, motilidad (progresiva, no progresiva e inmóviles), vitalidad, morfología normal y fragmentación del ADN mediante el ensayo SCD. Cada variable fue analizada de manera independiente, siguiendo los criterios metodológicos previamente descritos. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada parámetro evaluado.

5.3. Concentración espermática

La concentración espermática mostró diferencias significativas entre todos los grupos (ANOVA de una vía, $F(4,20)=5.236$; $p=0.0047$). El análisis post hoc de Tukey evidenció que el control ciclofosfamida presentó una disminución significativa en comparación con el control sano ($p=0.014$). Asimismo, los grupos tratados con extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum* (150, 300 y 450 mg/kg) mostraron concentraciones significativamente mayores respecto al control ciclofosfamida ($p<0.05$). No se observaron diferencias significativas entre las dosis evaluadas ni frente al control sano. El efecto del tratamiento explicó aproximadamente el 51% de la variabilidad de la concentración espermática ($\eta^2=0.51$).

Tabla 3. Concentración espermática (×10⁶/mL) en ratones BALB/c expuestos a ciclofosfamida y tratados *con Laccopetalum giganteum*. Grupos con letras distintas tienen un $p < 0.05$ para la prueba de Tukey.

Tratamiento	Concentración (Media ± DE) (×10⁶/mL)
Control sano	41.9 ± 5.2 (a)
Control ciclofosfamida	24.3 ± 6.5 (b)
Dosis de 150 mg/Kg	43.6 ± 9 (a)
Dosis de 300 mg/Kg	42.1 ± 10.8 (a)
Dosis de 450 mg/Kg	39.8 ± 4.4 (a)

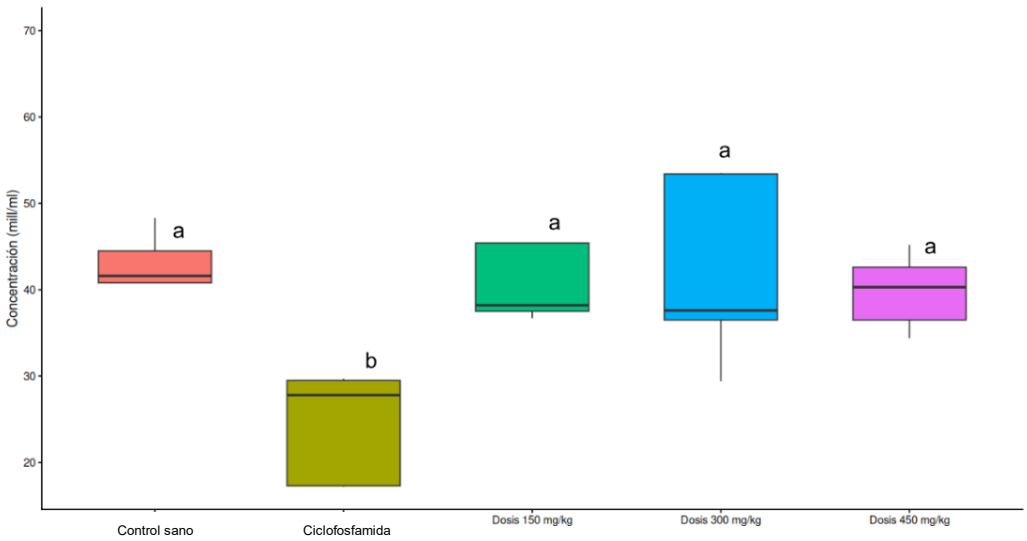


Figura 8. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la concentración espermática en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. El control ciclofosfamida mostró una disminución significativa en la concentración espermática en comparación con el control sano. Los grupos experimentales presentaron concentraciones significativamente mayores al control ciclofosfamida. Los datos se expresan como media ± desviación estándar.

5.4. Movilidad o motilidad espermática

5.4.1. Motilidad progresiva

Los espermatozoides con motilidad progresiva mostraron diferencias significativas entre todos los grupos (ANOVA de una vía, $F(4,20)=5.459$; $p=0.0039$). El análisis post hoc de Tukey reveló que el grupo control ciclofosfamida tuvo un valor significativamente menor en comparación al control sano ($p=0.0022$).

Por otro lado, la dosis experimental de 150 mg/kg no mostró un efecto reparador en esta variable ($p=0.0287$) ya que se obtuvo valores inferiores al control sano; mientras que las dosis de 300 y 450 mg/kg dieron resultados intermedios, puesto que no se diferenciaron significativamente del control sano ni del control ciclofosfamida ($p>0.05$). El tamaño del efecto fue alto ($\eta^2=0.52$), esto indicaría que el tratamiento explicó aproximadamente el 52% de la variabilidad en la motilidad progresiva.

Tabla 4. Espermatozoides con motilidad progresiva (%) en ratones BALB/c expuestos a ciclofosfamida y tratados con *Laccopetalum giganteum* (media ± DE). Grupos con letras distintas tienen un $p < 0.05$ para la prueba de Tukey.

Tratamiento	Motilidad progresiva ± SD (%)
Control sano	48.6 ± 11.4 [(a)]
Control ciclofosfamida	28.0 ± 3.5 [(b)]
Dosis de 150 mg/Kg	33.4 ± 5.2 [(b)]
Dosis de 300 mg/Kg	40.0 ± 7.1 [(ab)]
Dosis de 450 mg/Kg	38.6 ± 7.2 [(ab)]

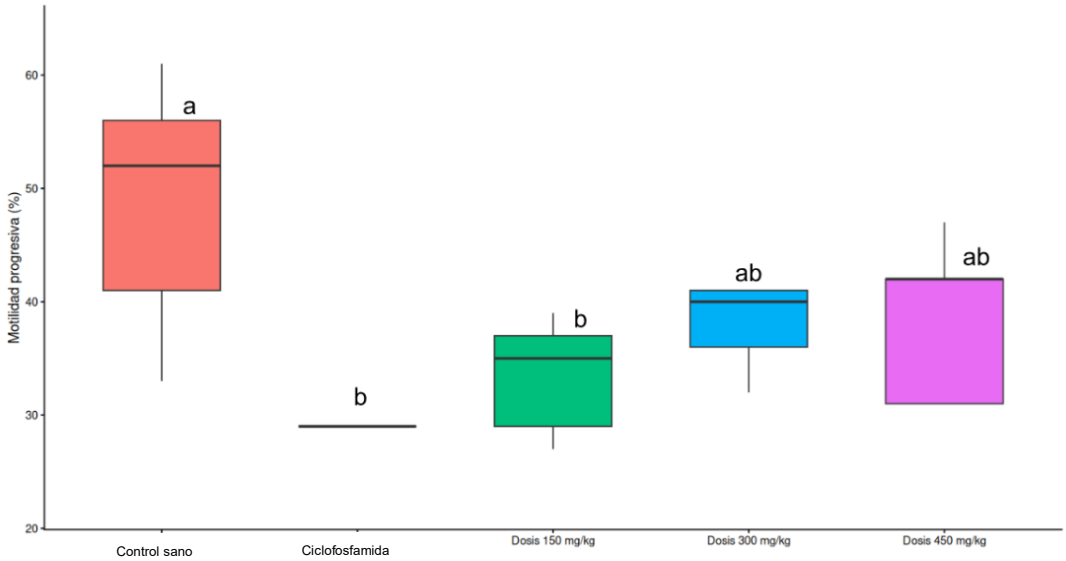


Figura 9. Efectos de *Laccopetalum giganteum* sobre la motilidad progresiva de espermatozoides (%) de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. Se observa una disminución de la motilidad progresiva en el grupo control ciclofosfamida en comparación con el control sano. La dosis de 150 mg/kg mostró valores similares al control ciclofosfamida, mientras que las dosis de 300 y 450 mg/kg presentaron valores intermedios. Las barras representan media ± desviación estándar.

5.4.2. Motilidad No progresiva

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en espermatozoides con motilidad no progresiva entre los grupos evaluados (ANOVA de una vía, $F(4,20)=1.511$; $p=0.237$).

Tabla 5. Espermatozoides con motilidad no progresiva (%) en ratones BALB/c expuestos a ciclofosfamida y tratados con *Laccopetalum giganteum* (media ± DE). Grupos con letras distintas tienen un $p < 0.05$ para la prueba de Tukey.

Tratamiento	Motilidad no progresiva ± SD (%)
Control sano	22.3 ± 4.5 (a)
Control ciclofosfamida	18.6 ± 6.1 (a)
Dosis de 150 mg/Kg	24.1 ± 5.2 (a)
Dosis de 300 mg/Kg	21.7 ± 4.8 (a)
Dosis de 450 mg/Kg	23.5 ± 5.6 (a)

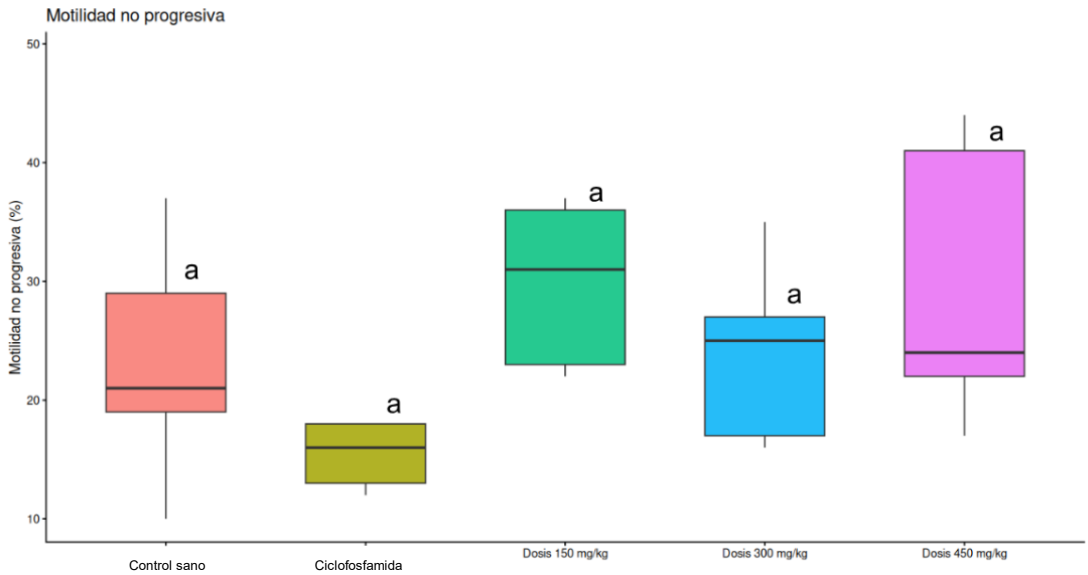


Figura 10. Efectos de *Laccopetalum giganteum* sobre la motilidad no progresiva de espermatozoides (%) de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

5.4.3. Inmóviles

El porcentaje de espermatozoides inmóviles tuvo diferencias significativas entre todos los grupos (ANOVA una vía, $F(4,20)=18.3$; $p=1.83\times10^{-6}$). El grupo control ciclofosfamida tuvo un mayor porcentaje de inmóviles respecto al control sano

(p=0.0000014). Por otra parte, los grupos experimentales tuvieron porcentajes significativamente menores en comparación al control ciclofosfamida ($p<0.001$); sin embargo no tuvieron diferencias significativas frente al control sano ($p>0.05$). El tamaño del efecto del tratamiento explicó aproximadamente el 79% de la variabilidad observada ($\eta^2=0.79$).

Tabla 6. Espermatozoides sin motilidad (%) en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida y *Laccopetalum giganteum* (media ± DE). Grupos con letras distintas tienen un $p < 0.05$ para la prueba de Tukey.

Tratamiento	Inmóviles ± SD (%)
Control sano	28.2 ± 2.9 [(a)]
Control ciclofosfamida	54.2 ± 7.9 [(b)]
Dosis de 150 mg/Kg	36.8 ± 4.8 [(a)]
Dosis de 300 mg/Kg	35.8 ± 4.3 [(a)]
Dosis de 450 mg/Kg	31.8 ± 5.0 [(a)]

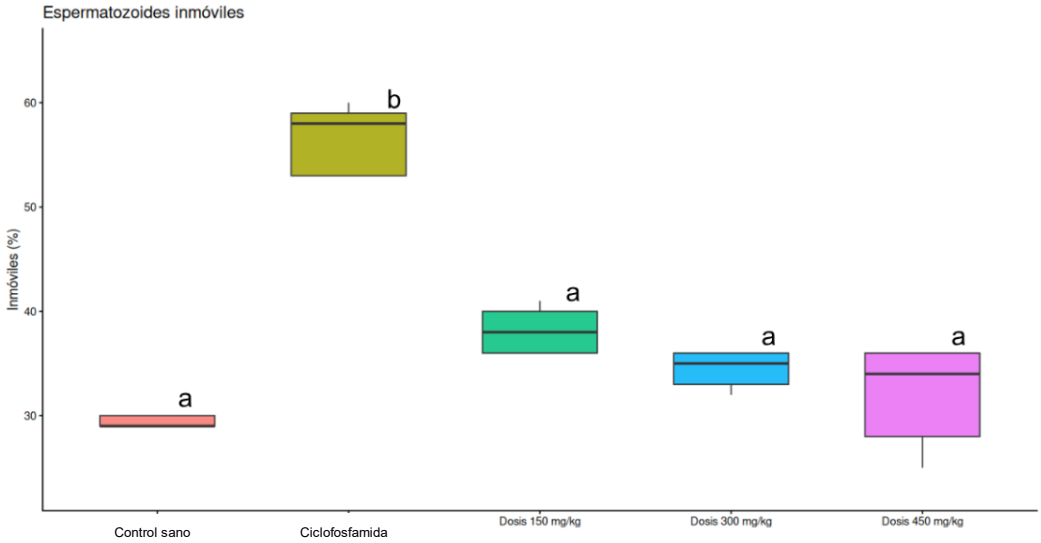


Figura 11. Efectos del extracto liofilizado de las flores *Laccopetalum giganteum* sobre los espermatozoides inmóviles (%) de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. El grupo control ciclofosfamida presentó un incremento significativo en comparación con el control sano. Los grupos experimentales mostraron porcentajes significativamente menores que el control ciclofosfamida, alcanzando valores comparables al control sano.

5.5. Vitalidad espermática

Para vitalidad espermática, expresada en porcentaje, hubo diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos (ANOVA de una vía, $F(4,20)=8.64$; $p=0.0003$). El análisis post hoc de Tukey mostró que hay una disminución significativa ($p<0.001$) entre el grupo control ciclofosfamida y el sano. Asimismo, las dosis de 150 y 450 mg/kg presentaron valores significativamente mayores respecto al control ciclofosfamida ($p<0.01$), mientras que la dosis de 300 mg/kg no mostró diferencias significativas frente a ningún grupo ($p>0.05$). No se observaron diferencias entre las dosis evaluadas ni frente al control sano. El tamaño del efecto del tratamiento explicó el 63% de la variabilidad en la vitalidad espermática ($\eta^2=0.63$).

Tabla 7. Vitalidad espermática (%) en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida y *Laccopetalum giganteum* (media ± DE). Grupos con letras distintas tienen un $p < 0.05$ para la prueba de Tukey.

Tratamiento	Vitalidad ± SD (%)
Control sano	78.8 ± 3.4 (a)
Control ciclofosfamida	61.8 ± 1.9 (b)
Dosis de 150 mg/Kg	73.8 ± 5.4 (a)
Dosis de 300 mg/Kg	70.4 ± 6.4 (ab)
Dosis de 450 mg/Kg	75.0 ± 5.8 (a)

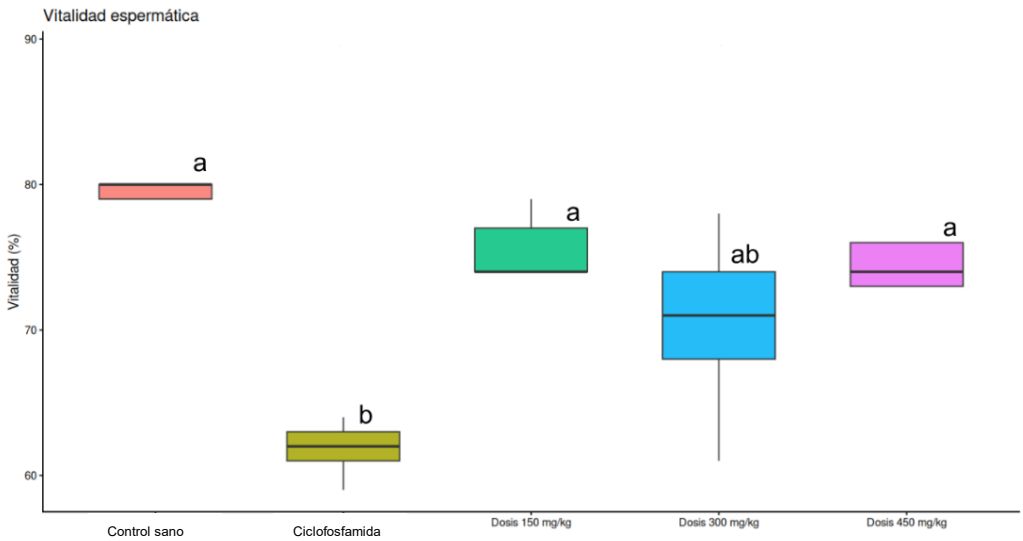


Figura 12. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la vitalidad espermática (%) de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. El grupo control ciclofosfamida presentó una reducción significativa de la vitalidad respecto al control sano. Las dosis de 150 y 450 mg/kg mostraron una recuperación significativa frente al control ciclofosfamida. Datos expresados como media ± DE.

5.6. Morfología espermática

Los resultados, mostraron que la morfología espermática tenía diferencias globales significativas según la prueba de Kruskal-Wallis ($\chi^2(4)=22.12$; $p<0.001$). Continuando con el análisis post hoc de Dunn con ajuste de Holm se logró determinar que entre el Control sano y ciclofosfamida hay diferencias significativas ($p<0.001$), y que ocurre de igual forma entre Control sano y la dosis de 300 mg/kg ($p=0.038$), y entre el Control ciclofosfamida y la dosis de 450 mg/kg ($p=0.011$). No se observaron diferencias significativas entre las demás comparaciones.

Tabla 8. Morfología normal espermática (%) en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida y *Laccopetalum giganteum*. Datos expresados como mediana (rango intercuartílico, Q1–Q3). Grupos que no comparten la misma letra difieren significativamente ($p < 0.05$).

Tratamiento	Morfología normal espermática (%)
Control sano	68 (65–69) [(a)]
Control ciclofosfamida	32 (28–33) [(c)]
Dosis de 150 mg/Kg	39 (36–40) [(ab)]
Dosis de 300 mg/Kg	37 (36–37) [(bc)]
Dosis de 450 mg/Kg	51 (51–51) [(ab)]

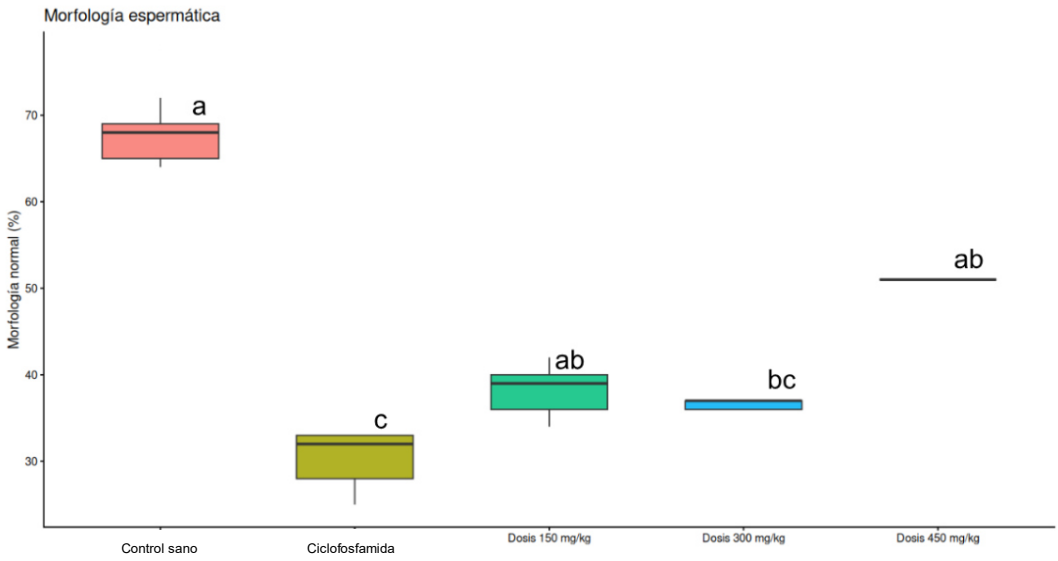


Figura 13. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la morfología normal espermática (%) de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. El grupo control ciclofosfamida tiene una morfología normal menor en comparación con el control sano. Asimismo, la dosis de 300 mg/kg mostró valores significativamente menores respecto al control sano, mientras que la dosis de 450 mg/kg presentó una recuperación significativa frente al control ciclofosfamida. Datos expresados como mediana.

5.7. Fragmentación de ADN espermático

5.7.1. Distribución de tipos de halo mediante ensayo SCD

- Se observó que el porcentaje de espermatozoides con halo grande tenían diferencias significativas entre los tratamientos (ANOVA de una vía, $p = 0.005$). El análisis post hoc de Tukey indicó que las dosis de 150 mg/kg ($p < 0.05$) y 450 mg/kg ($p < 0.05$) presentaron valores mayores en comparación con el control ciclofosfamida. Para el halo mediano, también se detectaron diferencias globales entre los grupos (ANOVA, $p = 0.0249$); sin embargo, en el análisis post hoc no se identificó comparaciones específicas con diferencias estadísticamente significativas.
- Para el halo pequeño no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas,

por lo tanto se aplicó un ANOVA de Welch y los resultados mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($p = 0.0219$), indicando así un efecto del tratamiento sobre esta categoría asociada a fragmentación de ADN.

Continuando con el estudio, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides sin halo (Kruskal–Wallis, $p = 0.1212$) ni en la categoría degradado (ANOVA de una vía, $p = 0.431$).

Tabla 9. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la distribución porcentual de los tipos de halo (SCD) en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. Datos expresados como media ± DE. Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según ANOVA + Tukey o ANOVA de Welch + Games-Howell, según correspondió.

Tratamiento	Halo grande (Media ± DE)	Halo mediano (Media ± DE)	Halo pequeño (Media ± DE)	Sin halo (Media ± DE)	Degradado (Media ± DE)
Control sano	18.14 ± 3.36 (ab)	81.02 ± 3.31	0.72 ± 0.46 (ab)	0.12 ± 0.18	0.00 ± 0.00
Control ciclofosfamida	14.12 ± 1.96 (b)	83.44 ± 1.61	2.40 ± 0.98 (b)	0.00 ± 0.00	0.04 ± 0.09
Dosis de 150 mg/Kg	20.34 ± 3.21 (a)	78.90 ± 2.99	0.52 ± 0.23 (a)	0.24 ± 0.33	0.00 ± 0.00
Dosis de 300 mg/Kg	16.58 ± 1.37 (ab)	83.06 ± 1.58	0.36 ± 0.26 (a)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Dosis de 450 mg/Kg	20.50 ± 2.80 (a)	79.10 ± 2.70	0.36 ± 0.26 (a)	0.04 ± 0.09	0.00 ± 0.00

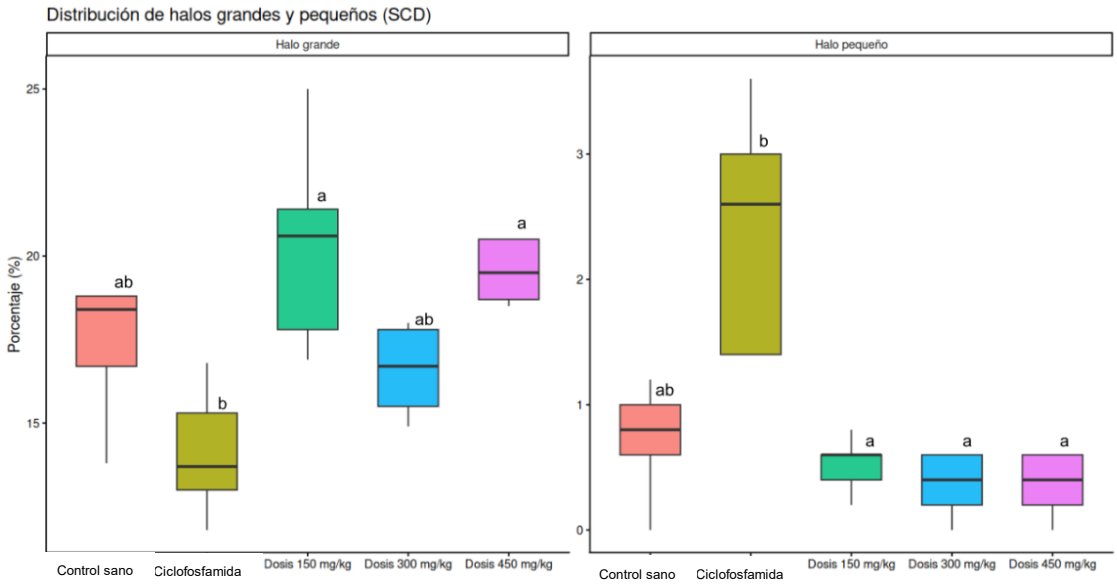


Figura 14. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre la distribución de halos espermáticos (SCD) de ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. El control ciclofosfamida presentó una menor proporción de halo grande y una mayor proporción de halo pequeño en comparación con el control sano. Los tratamientos con el extracto mostraron una tendencia a recuperar los valores hacia el control sano, principalmente por la reducción del halo pequeño. Datos expresados como media ± DE.

5.7.2. Índice de fragmentación de ADN

El índice de fragmentación (IF) en espermatozoides de ratón mostró diferencias significativas entre todos los grupos (ANOVA de Welch, $p = 0.01$). El grupo control ciclofosfamida fue significativamente mayor en comparación con los grupos tratados con 300 mg/kg (0.36 ± 0.26; $p < 0.05$) y 450 mg/kg (0.40 ± 0.20; $p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre el Control sano y los demás grupos ($p > 0.05$).

Tabla 10. Efecto de *Laccopetalum giganteum* sobre el índice de fragmentación de ADN en ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida. Datos expresados como media ± DE. Letras diferentes dentro de la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según ANOVA de Welch seguido de la prueba post hoc Games–Howell.

Tratamiento	Índice de Fragmentación (Media ± DE)
Control sano	0.84 ± 0.54 $^{(ab)}$
Control ciclofosfamida	2.44 ± 0.93 $^{(b)}$
Dosis de 150 mg/Kg	0.76 ± 0.30 $^{(ab)}$
Dosis de 300 mg/Kg	0.36 ± 0.26 $^{(a)}$
Dosis de 450 mg/Kg	0.40 ± 0.20 $^{(a)}$

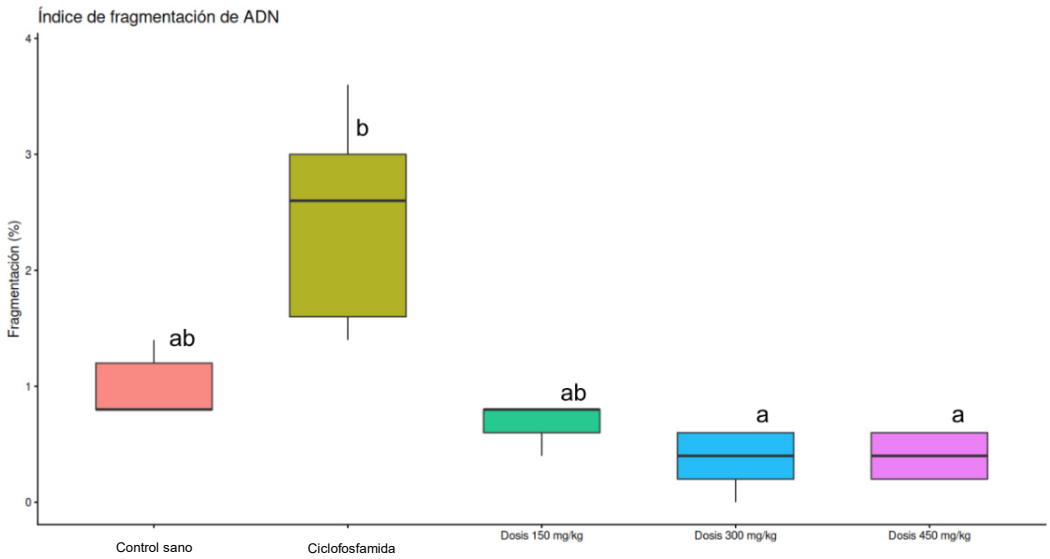


Figura 15. Índice de fragmentación de ADN (%) en ratones BALB/c tratados con *Laccopetalum giganteum* después de una exposición única a ciclofosfamida. El grupo control ciclofosfamida tiene un IF significativamente mayor a las dosis de 300 y 450 mg/kg. No se observaron diferencias significativas entre las demás comparaciones. Los datos se expresan como media ± DE. Letras diferentes indican diferencias significativas (ANOVA de Welch seguido de prueba de Games–Howell, $p < 0.05$).

6. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el extracto liofilizado de las flores de *Laccopetalum giganteum* tienen un efecto reparador sobre la calidad espermática en ratones BALB/c que fueron expuestos a una dosis única de ciclofosfamida. Esto se ha evidenciado en los resultados ya que el tratamiento con el liofilizado ha permitido mejorar el potencial reproductivo debido a que mejoró la concentración, motilidad, vitalidad y morfología espermática, así como por la reducción del índice de fragmentación de ADN.

No obstante dicha interpretación se logró gracias a los resultados del grupo tratado únicamente con ciclofosfamida, el cual mostró un deterioro significativo en dichos parámetros, confirmando así el impacto gonadotóxico del antineoplásico. Estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Bakhtiary *et al.,* (2014), quien evidenció un deterioro similar en modelos murinos.

El deterioro de estos parámetros está relacionado con la actividad de los subproductos de la Cy, acroleína y la mostaza fosforamida. Por un lado la mostaza fosforamida impide la división celular mediante la formación de enlaces cruzados irreversibles en el ADN, tanto entre como dentro de las cadenas de ADN, en las posiciones N-7 de la guanina, un proceso que reduce la proliferación celular y conduce a la muerte celular; mientras que por otro lado, la acroleína es un aldehído reactivo que posee la capacidad de generar ROS a un nivel tóxico, el cual puede afectar al tejido circundante (Fusco *et al.*, 2021). En consecuencia, los aductos formados interfieren con la transcripción y replicación, ocasionando una pérdida de las células espermatogoniales y un incremento en las rupturas de doble cadena del ADN (Koike *et al*., 2018). Simultáneamente, este daño impacta sobre el ambiente testicular, incluyendo las funciones de las células de Leydig, lo que altera la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada y merma los niveles séricos de testosterona, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH),

contribuyendo directamente a la reducción de la concentración espermática (Olowe *et al.*, 2024).

A nivel funcional, el incremento del nivel de ROS altera la motilidad espermática. En modelos murinos, Lu *et al.* (2015), reportó que la Cy induce estrés oxidativo evidenciado por el incremento en malondialdehído y la reducción de antioxidantes como el superóxido dismutasa y glutatión en tejido testicular. Por otro lado, Por otro lado, Danshina *et al.* (2010) demostró que la deficiencia de fosfoglicerato quinasa 2 (PGK2) en espermatozoides de ratón reduce marcadamente los niveles de ATP y la motilidad progresiva, asimismo Liu *et al.* (2021) determinó que el uso de ciclofosfamida en ratones reduce la concentración de dicha proteína. Por lo tanto, la disminución de la motilidad progresiva y el incremento de espermatozoides inmóviles se debe a una reducción en la disponibilidad de ATP, lo cual podría explicar los resultados del presente estudio cuyo resultado concuerda con el reporte gonadotrópico realizado por Olowe *et al.*, (2024).

El aumento del estrés oxidativo causado por la ciclofosfamida afecta a la vitalidad espermática; ello se corroboró en el presente estudio ya que hubo una disminución significativa del porcentaje de espermatozoides vivos en el grupo Control ciclofosfamida. Este efecto puede explicarse por la acción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre los lípidos y proteínas de la membrana plasmática, provocando su oxidación y pérdida de la permeabilidad selectiva, lo que facilita el ingreso de colorantes vitales como la eosina Y y refleja una pérdida de integridad celular (Libardo *et al.*, 2017; Bancroft & Layton, 2018). En contraste, los grupos tratados con *Laccopetalum giganteum* mostraron una recuperación significativa de la vitalidad espermática, lo que sugiere un efecto protector del extracto sobre la membrana celular, probablemente asociado a la acción antioxidante de sus compuestos bioactivos, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Bakhtiary en su estudio realizado en el año 2014, ya que logró incrementar la vitalidad espermática con tratamientos con crocina durante 35 días que fueron administradas después de una dosis única de ciclofosfamida.

Respecto a la morfología, la disminución de estructuras normales observada en el grupo tratado con ciclofosfamida podría estar relacionada con el impacto del ROS sobre organelos como el complejo de Golgi y sobre los microtúbulos involucrados en la formación del axonema, estructuras clave en la espermiogénesis (Machamer, 2015; Yogo, 2022). Por el contrario, la mejora observada en los grupos tratados con el extracto, especialmente a dosis de 450 mg/kg, sugiere un efecto protector sobre estas estructuras celulares.

Finalmente, el efecto genotóxico se manifiesta en la estabilidad de la cromatina. Los espermatozoides son vulnerables al daño por estrés oxidativo a nivel del ADN, esto debido poseen un limitado sistema de reparación y un diseño biológico con alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana (Fusco *et al.*, 2021). En función a ello, el presente estudio decidió evaluar la integridad del ADN y usar la técnica de dispersión de la cromatina (SCD), donde el grupo tratado con Cy presentó una transición predominante hacia halos pequeños y una mayor fragmentación genómica, confirmando que la toxicidad del antineoplásico trasciende la morfología y afecta la integridad de la información genética del gameto.

Por el contrario, los grupos tratados con el extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum* mostraron una recuperación significativa de la concentración espermática frente al Control ciclofosfamida. Este efecto reparador se vincula a la capacidad de la "pacra-pacra" para restaurar el microambiente hormonal, mediante la acción de la cantidad abundante de esteroides (++++), identificados en su perfil fitoquímico (Arroyo *et al.*, 2007) ya que si bien no hay una clasificación específica del metabolito secundario se sabe que según el estudio de Tarkowská *(*2019), las plantas superiores son capaces de producir precursores de la testosterona que pueden recuperar la producción espermática. Al normalizar esta hormona, se restablece el estímulo sobre las células de Sertoli, permitiendo que las células germinales puedan diferenciarse y especializarse (Coviello *et al.,* 2004). Esta respuesta se ve reforzada por la presencia de taninos y flavonoides presentes en

Laccopetalum giganteum, cuyas estructuras cuentan con un anillo aromático que se pueden hidroxilar reduciendo así el impacto del ROS (Muscolo *et al.,* 2024).

En cuanto a los parámetros funcionales, el extracto del liofilizado de *Laccopetalum giganteum* mostró una recuperación de la motilidad y vitalidad espermática. La mejoría en la motilidad progresiva (especialmente en dosis de 300 y 450 mg/kg) sugiere que los componentes antioxidantes de la planta logran preservar la integridad de las mitocondrias y el perfil proteico vinculado a la generación de ATP para el movimiento flagelar. Asimismo, el aumento de la vitalidad refleja una protección de la membrana plasmática; los flavonoides y compuestos fenólicos neutralizan el ROS, evitando la peroxidación lipídica que normalmente incrementa la permeabilidad de la membrana y permite el ingreso de colorantes vitales como la eosina Y (Libardo *et al*., 2017; Bancroft & Layton, 2018)

. Por otro lado, la morfología normal presentó una recuperación más evidente en la dosis de 450 mg/kg, sugiriendo que el extracto protege estructuras críticas como el complejo de Golgi y los microtúbulos del axonema durante la espermiogénesis (Machamer, 2015; Yogo, 2022).

Un hallazgo relevante obtenido en los resultados es que el liofilizado logra la preservación de la integridad del ADN espermático. Mediante la técnica de dispersión de la cromatina (SCD), se evidenció que las dosis de 300 y 450 mg/kg redujeron significativamente el índice de fragmentación inducido por la Cy. Este efecto genoprotector se asocia a la capacidad de los flavonoides, compuestos fenólicos y taninos para actuar como eliminadores de radicales libres que causan rupturas del ADN (Ikumawoyi *et al*., 2017), protegiendo al gameto en un estado de vulnerabilidad dado su limitado sistema de reparación de ADN.

Es relevante señalar que la recuperación de los valores espermáticos no mostró un patrón estrictamente dosis-dependiente en parámetros como la concentración y la vitalidad. Por

ejemplo, se evidenció que la concentración a dosis más alta (450 mg/kg), si bien hubo recuperación, fue ligeramente menor que las obtenidas con las menores dosis. Este fenómeno podría explicarse por la muy abundante cantidad de alcaloides (++++) presentes en el extracto (Arroyo *et al*., 2007), lo cuales según Yakubu (2012), concentraciones elevadas de ciertos alcaloides de origen vegetal pueden generar una interferencia farmacodinámica o efectos antagónicos sobre los niveles hormonales, sugiriendo que existe una ventana terapéutica óptima para el uso de las flores *L. giganteum* antes de alcanzar un umbral de saturación o interferencia metabólica.

Los efectos protectores observados en el presente estudio han demostrado que el extracto liofilizado de flores de *L. giganteum* puede mitigar el daño testicular y mejorar la calidad espermática al reducir el estrés oxidativo debido. Dichos resultados también se han observado en estudios que emplearon recursos etnobotánicos para recuperar la calidad seminal en ratones; por ejemplo, el uso de *Lepidium meyenii* (maca), una planta originaria de los Andes ha demostrado que su administración posterior a una dosis de Cy puede mitigar parcialmente la toxicidad gonadal inducida por ciclofosfamida, mejorando parámetros como el recuento espermático y la motilidad (Onaolapo *et al.,* 2018).

De manera similar, extractos de otras especies vegetales con alto contenido de compuestos fenólicos, como *Olea europaea* y *Rosa canina*, han mostrado efectos protectores frente al daño reproductivo inducido por este agente quimioterapéutico. En estos estudios se ha observado una mejora en la concentración, motilidad y viabilidad espermática, así como una disminución en marcadores de estrés oxidativo como el malondialdehído, lo que sugiere que el mecanismo protector estaría relacionado con la capacidad antioxidante de estos compuestos. (Rostamzadeh *et al.*, 2020; Parandin *et al.,* 2023). Por otro lado, respecto a la fragmentación de ADN se ha evidenciado que extractos liofilizados de plantas como *Myrciaria dubia* pueden reducir el impacto tóxico de la Cy al disminuir el índice de fragmentación de ADN mediante la técnica del SCD (Pino *et al.*, 2024).

Finalmente, en este contexto, los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que *Laccopetalum giganteum* podría ejercer un efecto reparador sobre el sistema reproductivo masculino expuesto a tratamientos oncológicos. Este hallazgo representa un avance y resalta la urgente necesidad de conservación. Debido a su compleja composición fitoquímica se deben establecer estrategias frente a la sobreexplotación y cambio climático, factores que podrían impulsar su extinción. Asimismo, se recomienda promover un manejo sostenible que permita aprovechar sus beneficios sin comprometer su crecimiento poblacional.

7. CONCLUSIONES

- El extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum* evidenció un efecto prometedor sobre la recuperación de la calidad espermática en ratones machos BALB/c previamente expuestos a una dosis única de ciclofosfamida, utilizada como modelo experimental de daño testicular y deterioro espermático. Este efecto reparador se manifestó mediante el incremento significativo de la concentración, vitalidad y morfología espermática, así como por la disminución del índice de fragmentación del ADN espermático y espermatozoides inmóviles.
- Las dosis de 300 y 450 mg/kg del extracto liofilizado de flores *de Laccopetalum giganteum* “pacra pacra” mostraron el mejor comportamiento global sobre la calidad espermática en ratones expuestos a ciclofosfamida. La dosis de 300 mg/kg destacó principalmente por la reducción del índice de fragmentación del ADN espermático, mientras que la dosis de 450 mg/kg presentó una respuesta más amplia al favorecer la concentración, vitalidad, morfología normal, reducción de espermatozoides inmóviles y conservar la integridad del ADN espermático. Esto sugeriría que las dosis de los tratamientos no siguen un comportamiento lineal dependiente de la dosis, sino una respuesta diferenciada de acuerdo con el parámetro analizado.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de toxicidad del extracto liofilizado de *Laccopetalum giganteum*, con el fin de establecer su perfil de seguridad farmacológica y determinar las dosis máximas toleradas antes de su aplicación en modelos clínicos.
- Determinar y optimizar la dosis única administrada de ciclofosfamida según el diseño experimental, debido a que en altas concentraciones podrían aumentar la mortalidad.
- Evaluar su impacto del extracto liofilizado sobre el desarrollo embrionario murino con el objetivo de evidenciar si la reducción del índice de fragmentación puede mejorar la obtención de nacidos vivos.
- Evaluar marcadores específicos de estrés oxidativo, para validar a nivel molecular su mecanismo de acción.
- Complementar el análisis con estudios histológicos a nivel testicular para poder observar la preservación de su arquitectura como la distribución de los túbulos seminíferos y el estado de las células de Sertoli y Leydig.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adler, A., Roth, B., Lundy, S. D., Takeshima, T., Yumura, Y., & Kuroda, S. (2023). Sperm DNA fragmentation testing in clinical management of reproductive medicine. *Reproductive Medicine and Biology*, *22*(1): e12547. https://doi.org/10.1002/rmb2.12547.

Anand, U., Dey, A., Chandel, A. K. S., Sanyal, R., Mishra, A., Pandey, D. K., De Falco, V., Upadhyay, A., Kandimalla, R., Chaudhary, A., Dhanjal, J. K., Dewanjee, S., Vallamkondu, J., & Pérez de la Lastra, J. M. (2022). Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics. En Genes and Diseases. Chongqing University. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007

Arroyo Acevedo, J. L., Barreda, A., Ráez, E., Jurado, B., Moral, G., Martínez, J., & Palomino, C. (2007). El extracto etanólico de las flores *de Laccopetalum giganteum* (pacra-pacra) aumenta la fertilidad en ratas. Anales de la Facultad de Medicina, 68(3): 238-243. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37968304

Bakhtiary, Z., Shahrooz, R., Ahmadi, A., & Zarei, L. (2014). Evaluation of antioxidant effects of crocin on sperm quality in cyclophosphamide treated adult mice. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, *5*(3), 213–218. https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4279645/

Bancroft, J. D. & Layton, C. (2018). 10—The hematoxylins and eosin. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, 8th ed.; Suvarna, SK, Layton, C., Bancroft, JD, Eds*, 126-138.

Bussmann, R. W., & Sharon, D. (2018). Plantas medicinales de los Andes y la Amazonía La flora mágica y medicinal del Norte del Perú. *Ethnobotany Research and Applications*, *15*, 1–293. Retrieved from: https://ethnobotanyjournal.org/index.php/era/article/view/1281

Candore (2022). CANfrag. Kit to assess Sperm DNA Fragmentation. REF: CA-001 https://es.scribd.com/document/871856021/DFI-Protocol . (Revisado el 22/02/2026)

Centro Nacional de Información Biotecnológica (2026). Resumen de compuestos de PubChem para CID 2907, ciclofosfamida. Recuperado el 25 de enero de 2026 de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyclophosphamide.

Cleveland Clinic Center for Medical Art & Photography. (2010). Section of the germinal epithelium in the seminiferous tubule [Ilustración]. Cleveland Clinic.

Coviello, A. D., Bremner, W. J., Matsumoto, A. M., Herbst, K. L., Amory, J. K., Anawalt, B. D., ... & Jarow, J. P. (2004). Intratesticular testosterone concentrations comparable with serum levels are not sufficient to maintain normal sperm production in men receiving a hormonal contraceptive regimen. *Journal of andrology*, *25*(6), 931-938.

Dabbish, E., Scoditti, S., Shehata, M. N., Ritacco, I., Ibrahim, M. A., Shoeib, T., & Sicilia, E. (2024). Insights on cyclophosphamide metabolism and anticancer mechanism of action: A computational study. *Journal of Computational Chemistry*, *45*(10): 663-670.

Díaz, P., Noblecilla, M., De Los Ríos, J., Pino, J., Ponce, C. 2006. Efecto Protector del Extracto Acuoso de *Uncaria tomentosa* Willd D. C. Contra el Daño Causado por Ciclofosfamida en la Línea Germinal Masculina. International Journal of Morphology 24 (1): 128. https://doi.org/10.4067/s0717-95022006000100020

Del Río, M. A. G. , & G. J. B. (2006). Fármacos antineoplásicos (I): revisión. *Farmacia profesional*, *20*(2): 60–64.d

El-Serafi, I., & Steele, S. (2024). Cyclophosphamide pharmacogenomic variation in cancer treatment and its effect on bioactivation and pharmacokinetics. *Advances in*

Pharmacological and Pharmaceutical Sciences, *2024*(1): 4862706.

Fernandez, Jose Luis, Johnston, Stephen, and Gosalvez, Jaime (2018). Sperm chromatin dispersion (SCD) assay. A clinician's guide to sperm DNA and chromatin damage. Edited by Armand Zini and Ashok Agarwal. Cham, Switzerland: Spinger.137-152. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71815-6_8

Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico [FONDECYT] & Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica [CONICYT]. (2009). *Aspectos bioéticos de la experimentación animal*. https://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2012/10/Libro-4-Aspectos-Bio%C3%A9ticos-de-la-Experimentaci%C3%B3n-Animal.pdf

Fuentes Paredes, F. de M., Mendoza Yanavilca, R. Amelia., Rosales Fernández, A. Lorenzo., Cisneros Tarmeño, R. Alberto. (2008). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio : ratón. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. https://hdl.handle.net/20.500.14196/117

Fusco, R., Salinaro, A. T., Siracusa, R., D'Amico, R., Impellizzeri, D., Scuto, M., ... & Calabrese, V. (2021). Hidrox® counteracts cyclophosphamide-induced male infertility through NRF2 pathways in a mouse model. *Antioxidants*, *10*(5), 778.

Ghafouri-Fard, S., Shoorei, H., Abak, A., Seify, M., Mohaqiq, M., Keshmir, F., Taheri, M., & Ayatollahi, S. A. (2021). Effects of chemotherapeutic agents on male germ cells and possible ameliorating impact of antioxidants. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *142:* 112040. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112040

Global Cancer Observatory (2020). https://pancan.org/news/new-global-cancer-statistics-released/ (Revisado el 3 de febrero del 2026)

González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *International*

journal of molecular sciences, *13*(11): 14026-14052.

Griswold, M., & Hogarth, C. (2022). Synchronizing spermatogenesis in the mouse. *Biology of Reproduction*, *107*(5): 1159-1165.

Gupta, D., Singh, S., Shukla, S., & Shrivastava, S. (2023). Oncofertility: treatment options from bench to bedside. *Cancer pathogenesis and therapy*, *1*(04): 284-289.

Hyman, J. H., & Tulandi, T. (2013). Fertility Preservation Options after Gonadotoxic Chemotherapy. *Clinical Medicine Insights: Reproductive Health*, *7*: CMRH.S10848. https://doi.org/10.4137/cmrh.s10848

Ikumawoyi, V., Agbaje, E., & Awodele, O. (2017). Antigenotoxic and antioxidant activity of methanol stem bark extract of Napoleona Vogelii Hook & Planch (Lecythidaceae) in cyclophosphamide-induced genotoxicity. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, *5*(7), 866.

Kanno, T. Y. N., Sensiate, L. A., Paula, N. A. D., & Salles, M. J. S. (2009). Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on the reproductive parameters of male mice. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *45*: 313-319.

Kenney, L. B., Laufer, M. R., Grant, F. D., Grier, H., & Diller, L. (2001a). High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer*, *91*(3): 613–621. https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010201)91:3<613::AID

Kenney, L. B., Laufer, M. R., Grant, F. D., Grier, H., & Diller, L. (2001b). High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer*, *91*(3): 613–621. https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010201)91:3<613::AID

Koike, M., Kanda, A., Kido, K., Goto, K., Kumasako, Y., Nagaki, M., Otsu, E., Araki, Y., Araki, Y., Kawabe, F., Kai, Y., & Utsunomiya, T. (2018). Effects of

cyclophosphamide administration on the in vitro fertilization of mice. *Reproductive Medicine and Biology*, *17*(3): 262–267. https://doi.org/10.1002/rmb2.12099

León, B. (2006). Ranunculaceae endémicas del Perú. Revista peruana de biología, , Vol. 13, Nº. 2, 2006 (Ejemplar dedicado a: Fortunato Herrera, Ramón Ferreyra y César Vargas, por su labor botánica e interés en la conservación de la flora peruana), pags. 580-581. ISSN 1727-993310. https://doi.org/15381/rpb.v13i2.1907.

Libardo, M. D. J., Wang, T. Y., Pellois, J. P., & Angeles-Boza, A. M. (2017). How does membrane oxidation affect cell delivery and cell killing?. *Trends in biotechnology*, *35*(8), 686-690.

Liu, X., Li, Q., Wang, Z., & Liu, F. (2021). Identification of abnormal protein expressions associated with mouse spermatogenesis induced by cyclophosphamide. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 25(3), 1624-1632.

Lu, W. P., Mei, X. T., Wang, Y., Zheng, Y. P., Xue, Y. F., & Xu, D. H. (2015). Zn (II)–curcumin protects against oxidative stress, deleterious changes in sperm parameters and histological alterations in a male mouse model of cyclophosphamide-induced reproductive damage. *Environmental toxicology and pharmacology*, *39*(2), 515-524.

Machamer, C. E. (2015). The Golgi complex in stress and death. *Frontiers in neuroscience*, *9*, 421.

Mehraban, Z., Gaffari Novin, M., Golmohammadi, M. G., & Nazarian, H. (2021). Effect of *Ceratonia siliqua* L. Extract on DNA fragmentation of sperm in adult male mice treated with cyclophosphamide. *Reproductive Sciences*, *28*(4): 974-981.

Ministerio de Salud [MINSA]. (2011). Compendio de normativa ética para uso por los Comités de ética en investigación. Recuperado el 05 de febrero de 2026 de:

https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/389748/Compendio_de_normativa_%C3%A9tica_para_uso_por_los_comit%C3%A9s_de_%C3%A9tica_en_investigaci%C3%B3n20191016-26158-1865bkz.pdf?v=1571210223

Morris, I. D. (2002). Sperm DNA damage and cancer treatment. En *International Journal of Andrology* 25(5):255–261). https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.2002.00372.x

Muscolo, A., Mariateresa, O., Giulio, T., & Mariateresa, R. (2024). Oxidative Stress: The Role of Antioxidant Phytochemicals in the Prevention and Treatment of Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(6), 3264. https://doi.org/10.3390/ijms25063264

National Institutes of Health (US) (2007). Biological Sciences Curriculum Study. NIH Curriculum Supplement Series [Internet]. Bethesda (MD): National Institutes of Health (US); Understanding Cancer. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/

Ogunro, O. B., & Ofeniforo, B. E. (2024). Fertility protective effects of Brillantaisia patula leaf extract against cyclophosphamide-induced ovarian damage in Wistar rats. *BMC biotechnology*, *24*(1): 88.

Olowe, Gideon & Obukohwo, Oyovwi & Nwangwa, Eze & Ejiro, Ohwin & Oghenetega, Onome. (2024). Cytotoxic Properties of Cyclophosphamide: A Focus on Its Mechanistic Impacts on Male Gonadal Functions. Journal of Exploratory Research in Pharmacology. 9. 106-115. 10.14218/JERP.2023.00025S.

Onaolapo, A. Y., Oladipo, B. P., & Onaolapo, O. J. (2018). Cyclophosphamide-induced male subfertility in mice: An assessment of the potential benefits of Maca supplement. *Andrologia*, *50*(3), e12911.

O'Donnell L, Smith LB.(2000). Endocrinology of the Testis and Spermatogenesis.

[Updated 2026 Jan 7]. In: Feingold KR, Adler RA, Ahmed SF, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279031/

Parandin, R., Ghowsi, M., & Dadbod, A. (2023). Protective effects of hydroalcoholic extract of *Rosa canina* L. fruit on cyclophosphamide-induced testicular toxicity in mice. *Avicenna journal of phytomedicine*, *13*(1), 7–17. https://doi.org/10.22038/AJP.2022.20893

Pino, J., Noblecilla, M., Díaz, P., León, K., Ponce, C. y R. Alvis. 2009. Efecto del extracto acuoso de Uncaria Tomentosa Wiild D.C. sobre la calidad espermática de ratones tratados con Ciclofosfamida. Científica 6(3):244 - 249. ISSN 1997 – 700X

Pino Gaviño, J.L., Pino Velásquez, P.V., Zarria Romero, J., Bell Cortez, C., Oliveros Rodríguez, N., Shiga Oshige, B. 2024. Effect of consumption of Camu Camu fruit extract on sperm DNA integrity in mice pretreated with a single dose of Cyclophosphamide. Revista de la Facultad de Medicina Humana 24(3):71-77. https://doi.org/10.25176/RFMH.v24i3.6682

Ragosta, M. E., Traini, G., Tamburrino, L., Degl'Innocenti, S., Fino, M. G., Dabizzi, S., ... & Marchiani, S. (2024). Sperm chromatin dispersion test detects sperm dna fragmentation mainly associated with unviable spermatozoa and underestimates the values with respect to tunel assay. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(8): 4481.

Rashidian, P. (2024). An update on oncofertility in prepubertal females. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, *53*(4): 102742.

Revilla Luis . (2022). *Cáncer en el Perú según resultados de la vigilancia epidemiológica, año 2021*. Unidad técnica de vigilancia epidemiológica de enfermedades no transmisibles. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades. Boletín Epidemiológico del Perú SE 05-2022 (del 30 de

enero al 5 de febrero del 2022). https://www.studocu.com/pe/document/universidad-nacional-de-san-agustin-de-arequipa/fisica/boletin-20225-24-202501-4/81287258

Rostamzadeh, A., Amini-Khoei, H., Korani, M. J. M., & Rahimi-Madiseh, M. (2020). Comparison effects of olive leaf extract and oleuropein compounds on male reproductive function in cyclophosphamide exposed mice. *Heliyon*, *6*(4).

Ruíz M y Mejía F. (2020). Plants Used in Traditional Medicine for Viral Respiratory Conditions. Rev. Rebiol 40(1):109-130

Sakkas, D., & Alvarez, J. G. (2010). Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertility and sterility*, *93*(4): 1027-1036.

Shiromizu, K., Thorgeirsson, S. S., & Mattison, D. R. (1984). Effect of cyclophosphamide on oocyte and follicle number in Sprague-Dawley rats, C57BL/6N and DBA/2N mice. *Pediatric pharmacology (New York, N.Y.)*, *4*(4): 213–221.

Simón, L., & Mariotti-Celis, M. S. (2024). Bioactive compounds as potential alternative treatments to prevent cancer therapy-induced male infertility. *Frontiers in Endocrinology*, *14:* 1293780.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3): 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Tarkowská D. (2019). Plants are Capable of Synthesizing Animal Steroid Hormones. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(14): 2585. https://doi.org/10.3390/molecules24142585

Timar, M., Banaei, S., Mehraban, Z., Salimnejad, R., & Golmohammadi, M. G. (2022).

Protective effect of saponin on sperm DNA fragmentation of mice treated with cyclophosphamide. *Andrologia*, *54*(2): e14336.

Vasquez, J. (2020). Efecto antiinflamatorio de un gel elaborado a base de las flores de Pacra Pacra *(Laccopetalum giganteum* weddel ulbrich) en *Rattus rattus var. albinus*. Tesis para optar el título profesional de Quimico Farmaceutico. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Universidad Católica Los Ángeles Chimbote. https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/20554

Vieira, C. P., Procópio, M. S., & Avelar, G. F. (2024). Optimization of spermatozoa analysis in mice: A comprehensive protocol. *Tissue and Cell*, *89:* 102463.

Watcho, P., Mpeck, I. R., Deeh Defo, P. B., Wankeu-Nya, M., Ngadjui, E., Bonsou Fozin, G. R., Kamtchouing, P., & Kamanyi, A. (2019). Cyclophosphamide-induced reproductive toxicity: Beneficial effects of Helichrysum odoratissimum (Asteraceae) in male Wistar rats. *Journal of Integrative Medicine*, *17*(5): 366–373. https://doi.org/10.1016/j.joim.2019.07.002

Woodruff, T. K. (2015). Oncofertility: A grand collaboration between reproductive medicine and oncology. En *Reproduction* 150(3):S1–S10). https://doi.org/10.1530/REP-15-0163

World Health Organization. (2021). *WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen* (5th ed.). World Health Organization. https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261

Yakubu, M. T. (2012). Effect of a 60-day oral gavage of a crude alkaloid extract from Chromolaena odorata leaves on hormonal and spermatogenic indices of male rats. *Journal of andrology*, *33*(6), 1199-1207.

Yogo, K. (2022). Molecular basis of the morphogenesis of sperm head and tail in

mice. *Reproductive medicine and biology*, *21*(1), e12466.

Zhang, Q. Y., Wang, F. X., Jia, K. K., & Kong, L. D. (2018). Natural product interventions for chemotherapy and radiotherapy-induced side effects. *Frontiers in pharmacology*, *9*: 1253.

Zhang, Y., Yang, A., Zhao, Z., Chen, F., Yan, X., Han, Y., ... & Wu, Y. (2024). Protein disulfide isomerase is essential for spermatogenesis in mice. *JCI insight*, *9*(12): e177743.

10. ANEXOS

Anexo 1. Identificación taxonómica de *Laccopetalum giganteum*

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

"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

CONSTANCIA N° 111-USM-MHN-2023

LA JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (infértil) recibida de **Yojaira Estefani Oré Acevedo,** bachiller de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ha sido estudiada y clasificada como: *Ranunculus giganteus* Wedd. (teniendo como sinónimo a *Laccopetalum giganteum* Ulbr.) y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

ORDEN : Ranunculales

FAMILIA : RANUNCULACEAE

GÉNERO : *Ranunculus*

ESPECIE : *Ranunculus giganteus* Wedd. (teniendo como sinónimo a *Laccopetalum giganteum* Ulbr.)

Nombre vulgar: "Pacra-Pacra"

Procedencia: Distrito Conchucos, Provincia Pallasca, Departamento Ancash

Determinado por: MSc. Hamilton Beltrán Santiago.

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 6 de junio de 2023

MUSEO DE HISTORIA NATURAL - Herbario San Marcos - USM - JEFE

Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-034, Lima 14, Perú
Telfs. (511)471-0117, 470-4471
265-6819, 619-7000 anexo 5703
e-mail: herbariousm@unmsm.edu.pe
https://museo.hn.unmsm.edu.pe

Anexo 2. Acta de aprobación del Comité de ética de la Facultad de Ciencia Biológicas.

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

CÓDIGO: N° 228-2025-CBE-FCB-UNMSM

FECHA: 26 de noviembre del 2025

PROYECTO: "EFECTO DEL EXTRACTO LIOFILIZADO DE *Laccopetalum giganteum* "PACRA PACRA" EN LA CALIDAD REPRODUCTIVA DE RATONES MACHOS SOMETIDOS A TRATAMIENTOS ONCOLÓGICOS"

INVESTIGADOR SOLICITANTE: Bach. Yojaira Estefani Oré Acevedo

TIPO DE PROYECTO: Proyecto de tesis de Título

La Bach. Yojaira Estefani Oré Acevedo, entregó al Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas una solicitud adjuntando toda la documentación completa el día 26 de noviembre del 2025, a fin de someter el proyecto de tesis de Título.

El proyecto y la documentación correspondiente fueron enviados y evaluados de forma presencial por todos los miembros del Comité de Bioética, quienes hicieron sus consultas y sugerencias en línea, cuyo levantamiento de observaciones fue realizado por la responsable del proyecto en el siguiente documento:
Link:

https://docs.google.com/document/d/1zLnNvEM03eVpqVbAwgpoYJJ7df8r6kCF/edit?usp=sharing&ouid=104394135786257304126&rtpof=true&sd=true

En la reunión de fecha 26 de noviembre del 2025, el Comité acordó otorgar la aprobación del proyecto.

En virtud de las consideraciones expuestas, el Comité concede la **Aprobación** para la realización del estudio propuesto.

Ciudad Universitaria, 28 de noviembre del 2025

Dr. JOAN LARA AMAT Y LEÓN
PRESIDENTE

Blga. CARMEN YAMASHIRO GUINOZA
SECRETARIA

Email: comitebioetica.biologia@unmsm.edu.pe