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

Efecto protector del extracto hidroalcohólico de *Myrciaria dubia* en genotoxicidad y fertilidad de ratones machos expuestos a imidacloprid

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en Zoología

AUTOR

Nayelli Fiorella ROJAS CORONEL

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

Rojas, N. (2026). *Efecto protector del extracto hidroalcohólico de Myrciaria dubia en genotoxicidad y fertilidad de ratones machos expuestos a imidacloprid*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Nayelli Fiorella Rojas Coronel
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	73120584
URL de ORCID	https://orcid.org/0009-0006-5345-0090
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	Lourdes Elena Arbaiza Prado
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07715318
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Zeze Humberto Bravo Gutiérrez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42952975
Miembro del jurado 2	

Nombres y apellidos	Jorge Antonio Zeballos Alva
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07544388
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.3.4. Reproducción
Grupo de investigación	Reproducción, biología del desarrollo y ecotoxicología
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de proyectos de ciencia, tecnología, innovación y emprendimiento (PRO-CTIE) para Estudiantes de la UNMSM 2024. B241028pro.
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM País: Perú Departamento: Lima Provincia:Lima Distrito: Cercado de Lima Dirección: Av. Carlos Germán Amézaga N° 375 Latitud: -12.0594 Longitud: -77.0822
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2024-2025
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 CON MENCIÓN EN ZOOLOGÍA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN PRESENCIAL DE TESIS)

Siendo las 10:13 horas del 09 de noviembre 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 con mención en Zoología** de **NAYELLI FIORELLA ROJAS CORONEL.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N.º UNMSM-20260087545**, la titulando expuso su tesis: **EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Myrciaria dubia* EN GENOTOXICIDAD Y FERTILIDAD DE RATONES MACHOS EXPUESTOS A IMIDACLOPRID,** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18,calificativo: Aprobado con mención honrosa

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga con mención en Zoología** a **NAYELLI FIORELLA ROJAS CORONEL** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 11:18 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 09 de noviembre de 2026.

LOURDES ELENA ARBAIZA PRADO
PRESIDENTA

JOSE LUIS RAFAEL PINO GAVIÑO
ASESOR

ZEZE HUMBERTO BRAVO GUTIERREZ
MIEMBRO

JORGE ANTONIO ZEBALLOS ALVA
MIEMBRO

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° 000044-2026-EPCB-FCB de la tesis, cuyo título es, "**EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Myrciaria dubia* EN GENOTOXICIDAD Y FERTILIDAD DE RATONES MACHOS EXPUESTOS A IMIDACLOPRID**", presentado por la bachiller **NAYELLI FIORELA ROJAS CORONEL** para optar el título profesional de Bióloga con mención en ZOOLOGIA

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 5 % 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 con mención en ZOOLOGIA.

Lima, 20 de octubre de 2026

Firma del Asesor

Nombres y Apellidos del asesor: 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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios,

porque ha estado siempre conmigo en cada momento importante de mi vida y me ha sabido guiar, incluso en los caminos más difíciles.

A mi madre, Velinda Coronel Cortez,

por estar siempre a mi lado en todo momento y por ser padre y madre para mí. Te amo mucho, mamá.

A los profesores Blgo. José Luis Rafael Pino Gaviño y Mg. Betty Elena Shiga Oshige,

por su valiosa guía científica y académica a lo largo de mi paso en el Laboratorio de Reproducción, Biología del Desarrollo y Ecotoxicidad.

DEDICATORIA

A mi madre, Velinda Coronel Cortez,

porque hemos llegado juntas a esta meta que durante años construimos con esfuerzo y perseverancia.

A mi familia,

por su apoyo incondicional. Su presencia ha sido fundamental en mi crecimiento personal y siempre los llevaré en el corazón.

A mi adorada Kira,

mi primera bebé de cuatro patas, que ya no está físicamente, pero que vive en cada recuerdo bonito que guardo de ella.

A mi preciosa Lola,

mi bebé de cuatro patas, porque en cada uno de sus abrazos encuentro un refugio de paz y una ternura que aligera cualquier peso.

GLOSARIO

ADN	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
CI	CONTROL IMIDACLOPRID
CONICYT	COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA
CSF	CONTROL SUERO FISIOLÓGICO
EHC	EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE CAMU-CAMU
EPA	UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY
EPC	ERITROCITOS POLICROMÁTICOS
EPC MN	ERITROCITOS POLICROMÁTICOS CON MICRONÚCLEOS
FIV	FECUNDACIÓN *IN VITRO*
FONDECYT	FONDO NACIONAL DE DESARROLLO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO
FSH	FOLLICLE-STIMULATING HORMONE
ICSI	INTRA CYTOPLASMIC SPERM INJECTION
IG	ÍNDICE DE GENOTOXICIDAD
IMI	IMIDACLOPRID
LH	LUTEINIZING HORMONE

MN	MICRONÚCLEOS
MOR	MÉDULA ÓSEA ROJA
nAChRs	NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR
OCDE	ORGANIZACIÓN PARA LA COOPERACIÓN Y EL DESARROLLO ECONÓMICOS
PBS	PHOSPHATE-BUFFERED SALINE
ROS	REACTIVE OXYGEN SPECIES

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN 11
2. MARCO TEÓRICO 13
2.1. Imidacloprid 13
2.1.1. Aspectos generales 13
2.1.2. Toxicidad en animales: sistémica, genética y reproductiva 14
2.1.3. Exposición en trabajadores agrícolas 15
2.2. *Myrciaria dubia*: camu-camu 16
2.2.1. Descripción botánica 16
2.2.2. Distribución geográfica 16
2.2.3. Composición de bioactivos 17
2.2.4. Usos tradicionales y farmacológicos 17
2.3. Aparato reproductor masculino 18
2.3.1. Proceso de la espermatogénesis 18
2.3.2. Parámetros de evaluación espermática 19
2.4. Genotoxicidad en médula ósea roja 20
2.4.1. Concepto general 20
2.4.2. Médula ósea roja 20
2.4.3. Prueba de micronúcleos en MOR 20
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 21
3.1. Hipótesis 21
3.2. Objetivos 22
3.2.1. Objetivo general 22
3.2.2. Objetivos específicos 22
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA 22
4.1. Materiales de laboratorio 22
4.1.1. Equipos 22
4.1.2. Reactivos 23
4.1.3. Insumos 23
4.2. Metodología 24
4.2.1. Animales de experimentación 24
4.2.2. Colecta del fruto de *Myrciaria dubia* 25

4.2.3. Extracción hidroalcohólica de *Myrciaria dubia* 25
4.2.4. Insecticida utilizado en el experimento 26
4.2.5. Diseño experimental 26
4.2.6. Prueba de espermatograma 27
4.2.7. Prueba de micronúcleos en MOR 28
4.2.8. Análisis de genotoxicidad 29
4.2.9. Análisis estadístico 30
5. RESULTADOS 30
5.1. Prueba de espermatograma 30
5.1.1. Motilidad espermática 30
5.1.2. Vitalidad espermática 32
5.1.3. Concentración espermática 34
5.2. Prueba de micronúcleos en MOR 35
6. DISCUSIÓN 37
7. CONCLUSIONES 39
8. RECOMENDACIONES 40
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 40

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Espermatogénesis y espermatozoide maduro.....19

Figura 2. Prueba de micronúcleos en MOR……..…….....21

Figura 3. Flujograma de la extracción hidroalcohólica de *Myrciaria dubia*.....26

Figura 4. Eritrocito inmaduro con micronúcleo (A) y eritrocitos maduros (B,C)….29

Figura 5. Efectos del IMI y EHC sobre la motilidad espermática…….....32

Figura 6. Efectos del IMI y EHC sobre la vitalidad espermática.....33

Figura 7. Efectos del IMI y EHC sobre la concentración espermática…….....34

Figura 8. Índice de genotoxicidad en MOR.....36

Tablas

Tabla 1. Diseño experimental.....27

Tabla 2. Promedios ± desviación estándar de motilidad espermática por grupo de tratamiento.....31

Tabla 3. Promedios ± desviación estándar de vitalidad y concentración espermática por grupo de tratamiento.....32

Tabla 4. Promedios ± desviación estándar del índice de genotoxicidad por grupo de tratamiento.....35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Estructura química del IMI……..58

Anexo 2. Prueba de Shapiro - Wilk para cada variable……..58

Anexo 3. Prueba de Levene para cada variable……..60

Anexo 4. Prueba de ANOVA de una vía para cada variable…….61

Anexo 5. Prueba de Tukey……..62

Anexo 6. Fruto de *Myrciaria dubia*…….67

Anexo 7. Distribución geográfica……..…….67

RESUMEN

La infertilidad masculina representa un problema de salud global que afecta a millones de personas en todo el mundo. En la actualidad, uno de los factores más estudiados como posible causa es la exposición a pesticidas utilizados de manera intensiva en la agricultura moderna. Entre ellos, el Imidacloprid (IMI), un insecticida del grupo de los neonicotinoides, ha mostrado efectos adversos como el aumento de malformaciones espermáticas, fragmentación del ADN, presencia de micronúcleos (MN), así como signos evidentes de estrés oxidativo y daño genético. Ante este escenario, el objetivo de esta investigación fue evaluar *in vivo* el efecto protector del extracto hidroalcohólico de camu-camu (EHC) sobre las células de la médula ósea roja y la calidad espermática en ratones macho *Mus musculus*, tras ser expuestos al insecticida IMI. Para ello, se establecieron cinco grupos experimentales: un control con suero fisiológico (CSF), un control con imidacloprid (CI, IMI 100 mg/kg) y tres grupos tratados con IMI 100 mg/kg + EHC a dosis de 100, 250 y 500 mg/kg, respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que el EHC reduce significativamente la genotoxicidad inducida por el IMI y mejora la calidad espermática, observándose los mejores efectos a la concentración de 500 mg/kg. Incluso se obtuvieron mejores resultados a comparación del control suero fisiológico, lo que sugiere un efecto antioxidante del extracto sobre los organismos de prueba gracias a su alta concentración de vitamina C, flavonoides y fenoles, así como a otros compuestos bioactivos que actúan de forma complementaria. En conclusión, los hallazgos indican que la administración del EHC favorece una recuperación progresiva de los parámetros espermáticos y reduce el índice de micronúcleos en las células hematopoyéticas de la médula ósea roja, posicionando a este extracto como una alternativa prometedora frente al daño reproductivo y genético inducido por pesticidas.

Palabras clave: imidacloprid, fertilidad, genotoxicidad, camu-camu.

ABSTRACT

Male infertility is a global health problem that affects millions of people worldwide. Currently, one of the most widely studied factors as a possible cause is exposure to pesticides used extensively in modern agriculture. Among these, imidacloprid (IMI), a neonicotinoid insecticide, has been shown to cause adverse effects such as increased sperm malformations, DNA fragmentation, the presence of micronuclei (MN), as well as clear signs of oxidative stress and genetic damage. Given this scenario, the objective of this study was to evaluate in vivo the protective effect of camu-camu hydroalcoholic extract (EHC) on red bone marrow cells and sperm quality in male *Mus musculus* mice following exposure to the insecticide IMI. To this end, five experimental groups were established: a control group with saline (CSF), a control group with imidacloprid (CI, IMI 100 mg/kg), and three groups treated with IMI 100 mg/kg + EHC at doses of 100, 250, and 500 mg/kg, respectively. The results showed that EHC significantly reduces IMI-induced genotoxicity and improves sperm quality, with the greatest effects observed at a concentration of 500 mg/kg. Even better results were obtained compared to the saline control, suggesting an antioxidant effect of the extract on the test organisms due to its high concentration of vitamin C, flavonoids, and phenols, as well as other bioactive compounds that act synergistically. In conclusion, the findings indicate that administration of EHC promotes a progressive recovery of sperm parameters and reduces the micronucleus index in red bone marrow hematopoietic cells, positioning this extract as a promising alternative against pesticide-induced reproductive and genetic damage.

Keywords: imidacloprid, fertility, genotoxicity, camu-camu.

1. INTRODUCCIÓN

La infertilidad de pareja, que los médicos diagnostican tras un año de relaciones sexuales sin protección en las que no se logra un embarazo, es una experiencia que deja huella. El sufrimiento interno, la presión social y los costes asociados generan un impacto profundo en el bienestar psicológico y en las relaciones de quienes la viven (WHO, 2025). Distintos estudios sugieren que la fertilidad puede verse afectada por factores externos, entre ellos: la exposición a calor excesivo, radiación, campos electromagnéticos y agentes químicos (Miyamoto et al., 2012). La infertilidad impacta a cerca de 70 millones de personas a nivel mundial (Bieniek & Lo, 2016). En varones puede originarse por problemas en el semen, alteraciones hormonales o enfermedades metabólicas como la obesidad, diabetes y algunos cánceres (Neto et al., 2016). Para su diagnóstico se realizan análisis hormonales y estudios del semen que permiten evaluar la concentración, pH, volumen, vitalidad, motilidad y fragmentación de los espermatozoides (Carson & Kallen, 2021). El tratamiento varía según la causa e incluye desde medicamentos hormonales hasta técnicas de reproducción asistida, como la fecundación *in vitro* (FIV), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) o la obtención directa de espermatozoides (espermatogénesis testicular asistida) (Woods et al., 2004, Carson & Kallen, 2021).

La espermatogénesis es un proceso altamente complejo regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal mediado por la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (Sharma & Agarwal, 2011). Este proceso se inicia en la pubertad y dura toda la vida (Christin-Maitre & Young, 2022). De acuerdo con Clouthier et al. (1996), la regulación de este proceso depende de las células de

Sertoli, células somáticas que recubren los túbulos seminíferos y proporcionan soporte estructural y nutrición a las células germinales. Estas células tienen receptores específicos para la FSH y la testosterona, hormonas principales reguladoras de la espermatogénesis (Sofikitis et al., 2008).

Desde la década de 1990, los insecticidas neonicotinoides, como el IMI, se han utilizado como pesticidas sistémicos para proteger cultivos como maíz, soja y trigo (Nauen & Denholm, 2005). Actúan sobre el sistema nervioso de los insectos y fueron ampliamente empleados en Europa, investigaciones revelaron efectos perjudiciales en abejas y otros polinizadores, así como posibles riesgos para la salud humana. Esto llevó a que, en 2018, la Unión Europea prohibiera varios de estos compuestos, incluido el IMI (Jactel et al., 2019). Estudios adicionales han demostrado que esta sustancia causa daños genotóxicos, evidenciados por el aumento de aberraciones cromosómicas, MN o aneuploidías en ratones, así como por su actividad mutagénica en bacterias. Esto indica que puede dañar el ADN, elevando el riesgo de cáncer o alteraciones genéticas en humanos y otros organismos tras exposiciones prolongadas o a dosis altas (Karabay & Oguz, 2005).

En la actualidad, crece el interés por investigar especies frutales nativas, y exóticas debido a su relevancia para la agroindustria y sus excelentes beneficios. Entre ellas destaca el arbusto amazónico *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh, conocido como camu-camu, perteneciente a la familia Myrtaceae. Esta especie es valorada por su potencial económico, sus propiedades nutricionales y sus actividades farmacológicas, incluyendo una alta capacidad antioxidante, efectos reparadores

en enfermedades crónicas y su uso para mejorar la fertilidad (Arellano-Acuña et al., 2016).

A pesar de que la infertilidad afecta a millones de personas, los sistemas de salud y las políticas públicas suelen no tomarle mucha importancia, destinando escasos recursos. A esto se añaden la tecnología deficiente, y medicamentos pocos accesibles por sus altos precios. Ante este panorama, surge la necesidad urgente de buscar soluciones basadas en la naturaleza. Por ello, este trabajo propone aprovechar el saber etnobotánico sobre especies amazónicas, en particular el camu-camu, un fruto con excelentes propiedades antigenotóxicas, restaurador de la calidad reproductiva y sistémica masculina, ofreciendo así una alternativa científica, accesible y sostenible frente a un problema tradicionalmente desatendido.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Imidacloprid

2.1.1. Aspectos generales

El IMI es un insecticida del grupo de los neonicotinoides, compuestos derivados de la nicotina que funcionan como agonistas de los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) ubicados en la membrana postsináptica. (FAO, 2008; Matsuda et al., 2001; Sur & Stork, 2003; Tomizawa & Casida, 2005). Su uso se ha expandido rápidamente, convirtiéndose en una parte importante del mercado global de insecticidas, representando el 23,7% de las ventas (Soumis, 2018). IMI es un análogo clorado de la nicotina y fue el primer neonicotinoide registrado como

insecticida por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) en 1992 (Mikolić y Karačonji, 2018). Se utilizan principalmente en cuatro ámbitos: protección de cultivos, control de plagas urbanas, aplicaciones veterinarias y piscicultura. En 2012, Europa autorizó más de 1000 usos para estos insecticidas en cultivos como maíz, arroz, patata y girasol, siendo el IMI y el tiametoxam los más empleados (Simon-Delso et al., 2015).

2.1.2. Toxicidad en animales: sistémica, genética y reproductiva

Su toxicidad oral se clasifica como moderada (FAO, 2001). Se ha documentado neurotoxicidad, inmunotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y efectos citotóxicos reproductivos en vertebrados (Bal et al., 2012a; Crosby et al., 2015; Lonare et al., 2014).

Por su parte, Burke (2016) administró IMI a ratones "*Mus musculus*" en hembras preñadas y observó que las crías presentaban comportamientos anormales, como depresión, aumento de la actividad motora, y mayor dominancia social.

En peces cebra "*Danio rerio*", altas concentraciones de IMI inducen una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando estrés oxidativo (Wang et al., 2018). Este estrés está vinculado al envejecimiento celular y, a enfermedades como trastornos cardiovasculares, neurodegenerativos y distintos tipos de cáncer (Avello & Suwalsky, 2006; Venereo, 2002). En un estudio de Nabiuni et al., (2015) con ratas expuestas a IMI, su descendencia femenina mostró una reducción significativa del diámetro de los folículos ováricos (desde primordiales hasta de Graaf) y del número de cuerpos lúteos, evidenciando un deterioro del desarrollo folicular y la ovulación. Al provocar daño y estrés oxidativo, genera MN y

fragmentación del ADN en espermatozoides (Costa et al., 2009; Tokumoto et al., 2013). En ratones, la exposición prolongada al insecticida causó malformaciones en la cabeza de los espermatozoides con dosis bajas (5,5 mg/kg/día durante 14 días) y efectos mutagénicos en espermatogonias con dosis altas (22 mg/kg/día durante 28 días) (Bagri et al., 2015). Asimismo, se detectó un aumento significativo de aberraciones cromosómicas y MN tras 28 días de tratamiento con la dosis más alta (22 mg/kg) (Bagri et al., 2016).

En cuanto a disrupción endocrina, Bal et al. (2012b) encontraron niveles reducidos de testosterona en ratones machos expuestos al insecticida. En ratas hembra, la administración oral de IMI a 20 mg/kg/día durante 90 días produjo alteraciones patomorfológicas y desequilibrios hormonales (Kapoor et al., 2011).

2.1.3. Exposición en trabajadores agrícolas

Los efectos del IMI en trabajadores agrícolas aún no se encuentran claramente caracterizados, debido a la dificultad técnica para detectar el compuesto o sus metabolitos, así como a la existencia de múltiples vías de exposición, incluyendo la ingestión, inhalación, contacto ocular y vía dérmica (Lari et al., 2023). Su aplicación en raíces o semillas provoca su acumulación en hojas, flores y frutos, con la posibilidad de transferirse al consumidor final (Angel et al., 2015; Chen et al., 2014; Daraghmeh et al., 2007; Fernandez-Alba et al., 1996; Liu et al., 2004; Mohapatra et al., 2012).

Si bien los pesticidas han aportado beneficios significativos a la humanidad en términos de control de plagas, mejora de productos agrícolas y manejo de

enfermedades, su uso extensivo ha comprometido tanto la salud humana como la integridad del medio ambiente (Mostafalou & Abdollahi, 2013).

Durante 2023 y principios de 2024, el sector agrícola mostró un crecimiento sostenido, con una contribución relevante al Producto Bruto Interno (PBI) (MINAGRI, 2024). Este desempeño se debe a la implementación de modelos de agricultura intensiva, caracterizados por la mecanización de cultivos, el uso generalizado de pesticidas y fertilizantes, y la adopción de técnicas agrícolas (Sarandon, 2002).

2.2. *Myrciaria dubia*: camu-camu

2.2.1. Descripción botánica

Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh es un arbusto amazónico perteneciente a la familia Myrtaceae, subfamilia Myrtoideae. Su fruto es de forma redondeada (Anexo 6), con un diámetro que oscila entre 1 a 3,2 cm, piel lisa, brillante y un peso promedio de 8,4 gramos (Akter et al., 2011). Durante su maduración, su color varía desde rojo intenso hasta un tono violáceo oscuro o negro, en su interior alberga de una a cuatro semillas siendo más frecuente encontrar dos o tres de forma elipsoidal y similar a un riñón, recubiertas por filamentos de tipo fibroso (Aguiar & Souza, 2015).

2.2.2. Distribución geográfica

Es una especie amazónica que crece de forma silvestre en zonas inundables (Chagas et al., 2012). Es originario de la selva amazónica y crece en zonas

inundables como ríos, arroyos y lagos de la Amazonía peruana, colombiana y brasileña, entre otras regiones de Sudamérica. (Castro et al., 2018; Renteria et al., 2022) (Anexo 7). En Perú, su aprovechamiento ha cobrado relevancia por su potencial económico y nutricional (Arellano-Acuña et al., 2016).

2.2.3. Composición de bioactivos

El camu-camu destaca por su alta concentración de compuestos bioactivos (Fujita et al., 2013). El análisis de su pulpa revela un alto contenido de humedad (94,1%) y una notable concentración de vitamina C (1,41 g/100 g), superando ampliamente los niveles de los cítricos (Justi et al., 2000). Este contenido disminuye ligeramente con la maduración: 1,49 g /100 g en frutos inmaduros frente a 1,38 g/100 g en maduros, además, es rico en flavonoides como antocianinas, kaempferol y quercetina, así como en polifenoles como el ácido elágico, que interviene en vías celulares asociadas a la apoptosis (Costa et al., 2013). Su capacidad antioxidante supera significativamente a la de otras frutas tropicales, también contiene carotenoides como β-caroteno, α-caroteno y luteína (Akter et al., 2011; García-Chacón et al., 2023).

2.2.4. Usos tradicionales y farmacológicos

Tradicionalmente, se ha utilizado en la Amazonía (IIAP, 2021) por sus propiedades reparadoras en enfermedades crónicas y para mejorar la fertilidad. En la investigación de Gonzáles et al. (2013) reportaron que su administración promueve la espermatogénesis, aumentando tanto la producción diaria como el reservorio epididimario de espermatozoides.

Estudios han demostrado su actividad antigenotóxica y antioxidante en células sanguíneas de ratones, asociada a sus altos niveles de vitamina C y compuestos fenólicos, capaces de eliminar radicales libres (Da Silva et al., 2012). Numerosos estudios clínicos han investigado la efectividad de la suplementación con antioxidantes en el tratamiento de la infertilidad masculina causada por estrés oxidativo (Durairajanayagam et al., 2014; Pino et al., 2024).

2.3. Aparato reproductor masculino

2.3.1. Proceso de la espermatogénesis

La espermatogénesis es un proceso celular complejo que ocurre en el epitelio de los túbulos seminíferos y requiere la acción de diversos péptidos y hormonas. Este proceso está controlado por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Schlatt & Ehmcke, 2014), principalmente a través de dos hormonas hipofisarias: la FSH y la LH (Cheng et al., 2010). Los testículos cumplen funciones esenciales en la reproducción masculina, además las células de Leydig sintetizan testosterona bajo la acción de la LH, necesaria para la producción espermática y las características sexuales masculinas. Por otro lado, las células de Sertoli brindan soporte a las células germinales, forman la barrera hematotesticular y producen sustancias nutritivas y reguladoras fundamentales para el desarrollo y supervivencia de los espermatozoides (De Kretser et al., 1998). Durante la espermatogénesis, las células germinales son vulnerables al estrés oxidativo; su defensa antioxidante depende del apoyo de las células de Sertoli, y este daño oxidativo es una de las principales causas de alteraciones en el ADN. En humanos, la producción diaria de

espermatozoides es relativamente baja en comparación con otras especies, con una elevada tasa de apoptosis (mayor al 75%) y presencia de células anormales, lo que disminuye la eficiencia reproductiva (Sharma & Agarwal, 2011).

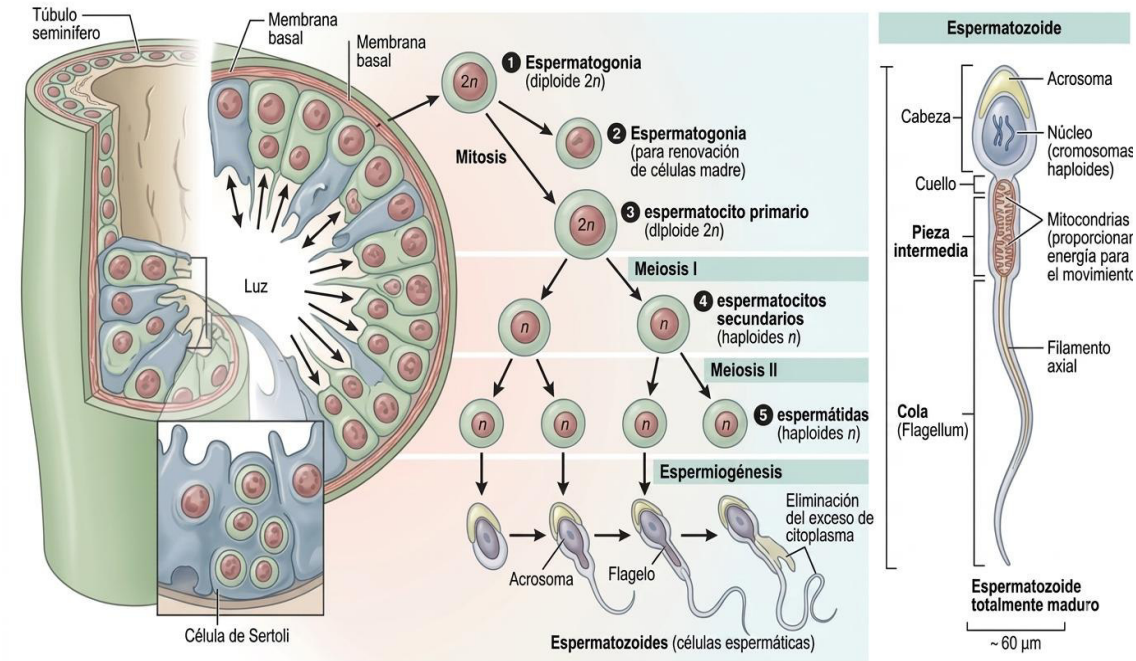


Figura 1. Espermatogénesis y espermatozoide maduro (Adaptado de Neto et al., 2016 y Endo et al., 2017).

En el proceso de espermatogénesis en ratones ocurre a lo largo de 35 días, se identifican cuatro etapas fundamentales: la diferenciación de las espermatogonias, el inicio de la meiosis, el comienzo de la elongación de las espermátidas y la liberación de los espermatozoides hacia la luz de los túbulos seminíferos.

2.3.2. Parámetros de evaluación espermática

Según WHO (2010) los principales parámetros para evaluar la calidad espermática incluyen: motilidad (progresiva, no progresiva e inmóvil), vitalidad (vivos y muertos), y concentración espermática (millones/mL). En este proyecto se realizaron las mediciones de tres parámetros: motilidad, vitalidad y concentración.

2.4. Genotoxicidad en médula ósea roja

2.4.1. Concepto general

La genotoxicidad es la capacidad de ciertos agentes tanto químicos como físicos dañan el material genético (ADN) de las células. Este daño puede originar mutaciones en las células germinales y somáticas (Mohamed et al., 2017).

2.4.2. Médula ósea roja

El principal sitio donde se produce la sangre es la MOR, lugar donde se realiza la hematopoyesis, formación de todas las células sanguíneas (Pantoja & Alba, 2015). Dado que las células progenitoras presentes en la MOR se dividen con frecuencia, son especialmente vulnerables al daño en su material genético causado por sustancias o agentes genotóxicos (Udroiu & Sgura, 2016).

2.4.3. Prueba de micronúcleos en MOR

El MN se forma por fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros que no logran integrarse en el núcleo hijo durante la mitosis, es como un núcleo pequeño, fácil de identificar (Luzhna et al., 2013). A diferencia de otras pruebas, la prueba de MN es rápido, no necesita células en metafase y está bien respaldado por guías internacionales como las de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) (Kang et al., 2013). Se utiliza generalmente para evaluar sustancias *in vivo* (Hayashi, 2016) y sólo se expresan en células que han realizado su etapa de división celular completa (Golbamaki et al., 2015). Dado que los plaguicidas podrían ocasionar daños genéticos, la prueba de MN es utilizada por su alta eficacia y bajo costo (Matheus Lobo & Bolaños, 2014).

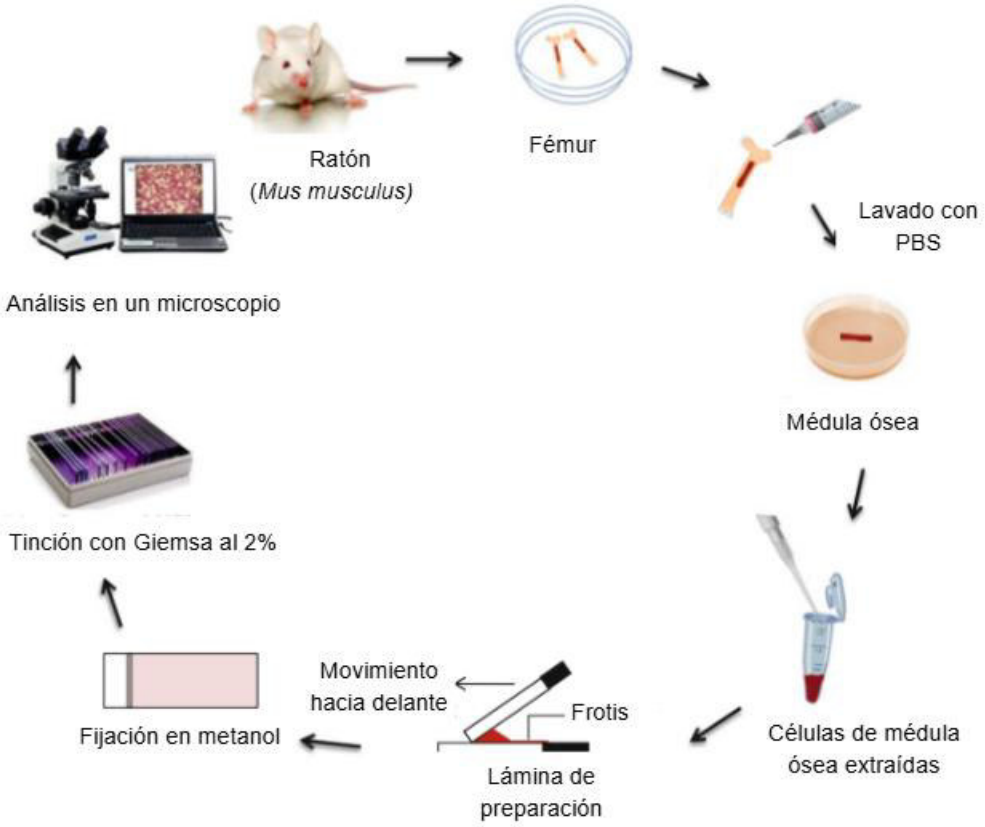


Figura 2. Prueba de micronúcleos en MOR. Tomado de Jain & Pandey (2019). Modificado por el autor.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

El EHC protege contra el daño genotóxico inducido por Imidacloprid en la médula ósea roja de ratones y mejora la calidad espermática.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

Evaluar *in vivo* el efecto protector del EHC a nivel de las células de la MOR y en la calidad espermática en ratones macho *Mus musculus*, después de ser expuestos con el insecticida IMI.

3.2.2. Objetivos específicos

- Demostrar el efecto genotóxico de la administración de IMI en las células hematopoyéticas de la MOR de *Mus musculus*, mediante la prueba de MN.
- Evaluar el efecto citotóxico de la administración de IMI en los espermatozoides de *Mus musculus,* mediante la prueba de espermatograma.
- Analizar el efecto antigenotóxico en células hematopoyéticas de la MOR de *Mus musculus* tratados con EHC.
- Evaluar la mejora de los parámetros espermáticos sometidos a tratamientos con el EHC en *Mus musculus*, después de ser expuestos con el IMI.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Materiales de laboratorio

4.1.1. Equipos

- Microscopio con cámara fotográfica incorporada (Nikon)
- Centrífuga (Labnet)
- Platina térmica (Chicago Surgical & Electrical Co.)

- Balanza analítica (Boeco)
- Incubadora (Fisher Scientific)
- Computadora personal con el software R Studio (licencia libre)

4.1.2. Reactivos

- Metanol absoluto (Merck)
- Etanol absoluto (Merck)
- Cloruro de Sodio (Sigma-Aldrich)
- PBS (Merck)
- Giemsa (Merck)
- Aceite de inmersión (Nikon)
- Eosina amarillenta (Merck)
- Agua destilada
- Imidacloprid (Controller)

4.1.3. Insumos

- Cámara de Neubauer
- Láminas portaobjetos
- Láminas cubreobjetos 22x22 mm y 22x60 mm
- Micropipeta 10 µL, 200 µL y 1000 µL
- Sonda orogástrica # 22
- Estuche de disección
- Microtubos 1,5 mL y 2 mL
- Papel lente Whatman

- Tips con filtro de 10 µL, 200 µL y 1000 µL
- Pisceta 250 mL
- Tubos de 15 mL y 50 mL
- Pipeta Pasteur
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla quirúrgica

4.2. Metodología

4.2.1. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones macho de la cepa Balb/c, de 6 a 7 semanas de edad y con un peso promedio de 27 g, provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Salud (INS). Los animales fueron sometidos a un período de aclimatación de al menos 15 días en las instalaciones del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, donde se desarrolló la fase experimental, que tuvo una duración de 35 días. Durante todo este tiempo, se mantuvieron bajo condiciones estándar: ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, temperatura entre 20 y 25 °C, humedad relativa del 40–70%, alimentación con dieta balanceada Bedoce (PURINA) y agua *ad libitum*. Al finalizar el periodo experimental, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Todos los procedimientos realizados estuvieron sujetos a las normas de bioética y bienestar animal establecidas por los comités correspondientes (FONDECYT & CONICYT, 2009; INS, 2010).

4.2.2. Colecta del fruto de *Myrciaria dubia*

El fruto de *Myrciaria dubia* fue adquirido en el Mercado de abastos Conzac, ubicado en el distrito de Los Olivos, provincia y departamento de Lima, Perú, durante el mes de febrero de 2025. Para la obtención del zumo, se seleccionaron únicamente frutos en estado de madurez óptima, los cuales fueron sometidos a un proceso manual de despulpado, que consistió en la eliminación cuidadosa de las semillas y las cáscaras.

4.2.3. Extracción hidroalcohólica de *Myrciaria dubia*

El fruto fue procesado mediante una extracción hidroalcohólica, metodología empleada en el estudio de Campos-Correa & Gutiérrez-Landa (2018). El procedimiento inició con la separación de la pulpa del camu-camu, la cual fue procesada junto con etanol al 70 % en una proporción de 200 g por cada 450 mL. Esta mezcla se mantuvo en maceración por siete días a temperatura ambiente dentro de envases ámbar. Posteriormente, se filtró con papel filtro y el filtrado se sometió a evaporación en incubadora a 40 °C. Finalmente, el residuo seco fue disuelto en solución salina para alcanzar las concentraciones propuestas en el estudio.

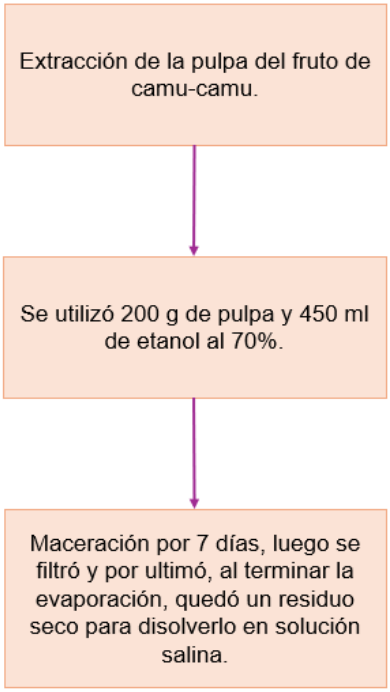


Figura 3. Flujograma de la extracción hidroalcohólica de *Myrciaria dubia*.

4.2.4. Insecticida utilizado en el experimento

El insecticida empleado fue Controller 250 mL en presentación frasco, producto hecho con una concentración de 350 g/L de la marca Neoagrum.

4.2.5. Diseño experimental

Se establecieron 5 grupos experimentales, cada uno compuesto por 5 ratones. El tratamiento tuvo una duración de 35 días, correspondiente a la duración total del ciclo espermatogénico en ratones (Arencibia et al., 2009; Ibtisham et al., 2017).

Tabla 1. Diseño experimental.

Ratones macho (n = 25)		
N °	**Grupo**	**Detalles del tratamiento**
I	CSF	Cloruro de Sodio 0,9%
II	CI	IMI 100 mg/kg + Cloruro de Sodio 0,9%
III	IMI + EHC 100	IMI 100 mg/kg + EHC 100 mg/kg
IV	IMI + EHC 250	IMI 100 mg/kg + EHC 250 mg/kg
V	IMI + EHC 500	IMI 100 mg/kg + EHC 500 mg/kg

El primer grupo correspondió al Control Suero Fisiológico (CFS); el segundo, al Control Imidacloprid (CI); y los grupos tercero, cuarto y quinto recibieron concentraciones seriadas del EHC en combinación con una dosis fija de IMI (100 mg/kg). Ambas sustancias se administraron diariamente, en dosis única, durante 35 días consecutivos.

La administración se realizó por vía oral, mediante sonda orogástrica. La dosis seleccionada de 100 mg/kg de IMI es equivalente al 22 % de la DL50 (450 mg/kg) reportada para este insecticida (Tomizawa & Casida, 2005).

4.2.6. Prueba de espermatograma

Para la obtención de las muestras, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente, se extrajo la cola del epidídimo, región donde se almacenan los espermatozoides maduros. La muestra fue colocada en un

microtubo de 2 mL que contenía 1 mL de solución salina precalentada a 37 °C en una incubadora. El microtubo con la muestra se mantuvo en incubación a 37 °C hasta su procesamiento para las pruebas descritas a continuación. Se empleó el protocolo descrito por la WHO (2010):

Motilidad: Se contaron 100 espermatozoides en total. Se colocó una gota de la muestra sobre una lámina para realizar el conteo de espermatozoides según su capacidad de movilización: movilidad progresiva rápida y lenta, movilidad no progresiva e inmóviles. Se observó mediante un microscopio de campo claro a un aumento de 400X.

Vitalidad: Se contaron 100 espermatozoides en total. Se colocó una gota de la muestra sobre una lámina y se realizó la tinción de eosina; donde los espermatozoides teñidos se determinaron como muertos y los no coloreados como vivos. Se observó mediante un microscopio de campo claro a un aumento de 400X.

Concentración: Se realizó una dilución 1:20 (10 µL de muestra + 190 µL de solución salina) y se mantuvo a 37 °C. Luego, se colocaron 10 µL de esta mezcla en la cámara de Neubauer y se observó al microscopio a 400X. Para el recuento, se utilizó el cuadrante central, donde se contabilizaron 100 espermatozoides.

4.2.7. Prueba de micronúcleos en MOR

Se siguió el protocolo de Hayes et al. (2009) con algunas modificaciones para el desarrollo de la prueba de micronúcleos en MOR. Primero se procedió con el sacrificio del ratón, vía dislocación cervical; posterior a ello, se extrajeron ambos

fémures del ratón y se llevaron a un microtubo con buffer fosfato salino (PBS) para el lavado y fragmentación de cada fémur con una tijera. Se formaron dos fases; de la fase líquida se extrajeron 200 µL, se suspendieron en 100 µL de PBS para ser llevados a centrifugar a 1500 rpm por 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µL de PBS suplementado para realizar un frotis en una lámina portaobjetos limpia; se dejaron secar en la incubadora a 37 °C por un periodo de 15 minutos, para proceder con la fijación con metanol absoluto a 4 °C por 12 minutos y la tinción se realizó con colorante Giemsa al 2% durante 17 minutos. Una vez finalizado, se procedió a montar y sellar la lámina con Entellan y, se analizaron las láminas al microscopio a un aumento de 1000x.

4.2.8. Análisis de genotoxicidad

Para el cálculo del índice de genotoxicidad (IG), se evaluaron 2000 células en total por cada grupo experimental, entre ellas: células binucleadas, eritrocitos normocromáticos, eritrocitos policromáticos y eritoblastos, pero para este análisis se consideraron exclusivamente eritrocitos policromáticos con micronúcleos (EPC MN) para su medición por cada grupo.

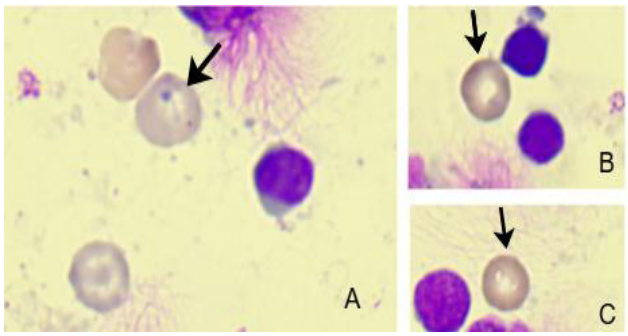


Figura 4. Eritrocito inmaduro con micronúcleo (A) y eritrocitos maduros (B, C). Tinción de Giemsa, 1000X.

4.2.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron ingresados en el software R Studio, se trabajaron su promedio ± desviación estándar por cada variable, se realizaron gráficas de barras para hallar diferencias y discutir sobre ello tanto en la prueba de espermatograma como la prueba de micronúcleos. Se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para analizar si la distribución es normal entre las variables, si es normal se seguirá con la prueba de ANOVA (paramétrico) y sí no es normal se seguirá con la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrico) a un nivel de significancia $p < 0,05$. Por último, se realizó la prueba post hoc (Tukey) en todos los grupos con la finalidad de compararlos y hallar diferencias significativas entre las dosis.

5. RESULTADOS

5.1. Prueba de espermatograma

5.1.1. Motilidad espermática

Los resultados del ensayo de motilidad espermática mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados. En el CSF, se observó un 31,4 ± 4,39 de espermatozoides con motilidad progresiva, un 49,2 ± 2,86 con motilidad no progresiva y un 19,4 ± 4,39 de células inmóviles. Por el contrario, el CI presentó una marcada disminución de la motilidad progresiva (10,0 ± 1.58) y no progresiva (20,8 ± 1,92), junto con un elevado porcentaje de espermatozoides inmóviles (69,2 ± 1,30), lo que confirma el efecto inhibitorio de motilidad a causa del IMI. En los grupos tratados con IMI más concentraciones crecientes de EHC (100,

250 y 500 mg/kg), se observó un aumento progresivo y dependiente de la dosis en la motilidad progresiva, alcanzando valores de 48,0 ± 2,28; 53,4 ± 7,06; y 76,2 ± 4,76, respectivamente. Paralelamente, el porcentaje de espermatozoides inmóviles disminuyó de forma inversamente proporcional, registrándose 22,8 ± 7,98; 13,6 ± 4,62; y 8,4 ± 4,72, respectivamente (Tabla 2 y Figura 5).

Tabla 2. Promedios ± desviación estándar de motilidad espermática por grupo de tratamiento.

Grupo de tratamiento	Motilidad Progresiva	Motilidad No Progresiva	Inmóvil
CSF	31,4 ± 4,39	49,2 ± 2,86	19,4 ± 4,39
CI	10,0 ± 1,58	20,8 ± 1,92	69,2 ± 1,30
IMI + EHC 100	48,0 ± 2,28	29,2 ± 9,01	22,8 ± 7,98
IMI + EHC 250	53,4 ± 7,06	33,0 ± 4,95	13,6 ± 4,62
IMI + EHC 500	76,2 ± 4,76	15,4 ± 2,97	8,4 ± 4,72

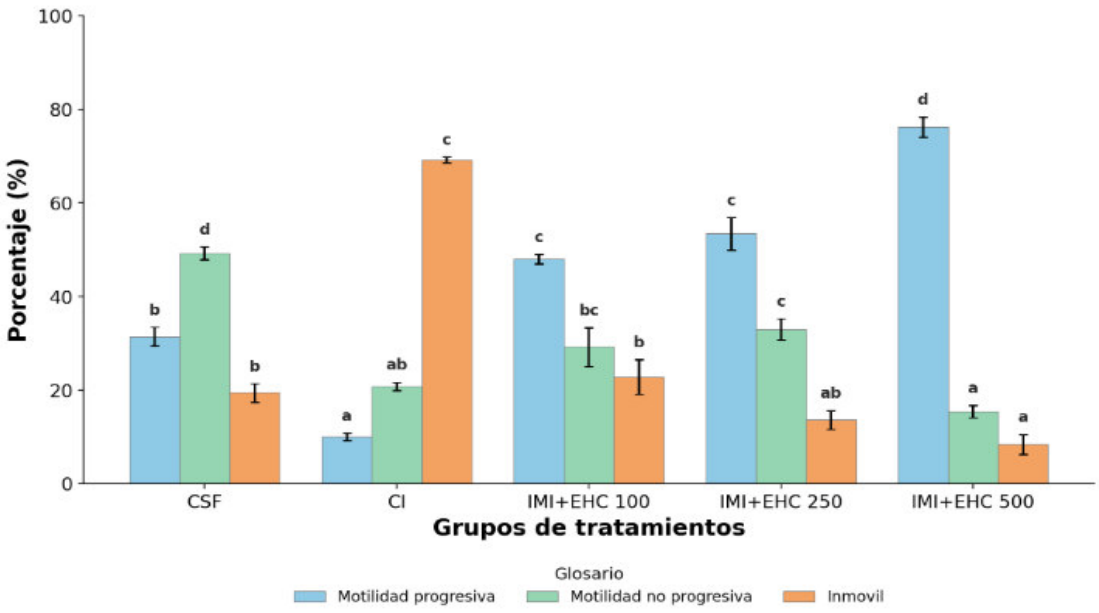


Figura 5. Efectos del IMI y EHC sobre la motilidad espermática. Las barras representan la media ± desviación estándar de la media del porcentaje de motilidad progresiva, motilidad no progresiva e inmovilidad espermática. Letras distintas sobre las barras de una misma variable indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (prueba de Tukey HSD, $p < 0,05$, posterior a ANOVA de una vía); grupos que comparten al menos una letra no difieren significativamente entre sí.

5.1.2. Vitalidad espermática

En cuanto a la viabilidad espermática, el CSF mostró un 51,6 ± 3,36 de espermatozoides vivos y un 48,4 ± 3,36 de muertos. En el CI, se observó una marcada reducción de la vitalidad, con solo un 18,8 ± 5,07 de células vivas y un 81,2 ± 5,07 de muertas, confirmando el efecto citotóxico del IMI respecto al CSF. En los grupos tratados con IMI más concentraciones crecientes de EHC (100, 250 y 500 mg/kg), se evidenció un aumento progresivo del porcentaje de espermatozoides vivos en función de la dosis: 47,8 ± 5,26; 69,2 ± 1,30; y 80,0 ± 9,54, respectivamente. Estos resultados indican que el tratamiento IMI + EHC, especialmente a la concentración más alta (EHC 500 mg/kg), revierte parcialmente el efecto provocado por el IMI, sugiriendo un efecto protector o recuperador sobre la integridad celular espermática (Tabla 3 y Figura 6).

Tabla 3. Promedios ± desviación estándar de vitalidad y concentración espermática por grupo de tratamiento.

Grupo de tratamiento	Vivos	Concentración
CSF	51,6 ± 3,36	9,55 ± 6,10
CI	18,8 ± 5,07	6,76 ± 4,00
IMI + EHC 100	47,8 ± 5,26	14,41 ± 4,18
IMI + EHC 250	69,2 ± 1,30	22,15 ± 5,05
IMI + EHC 500	80,0 ± 9,54	28,23 ± 3,36

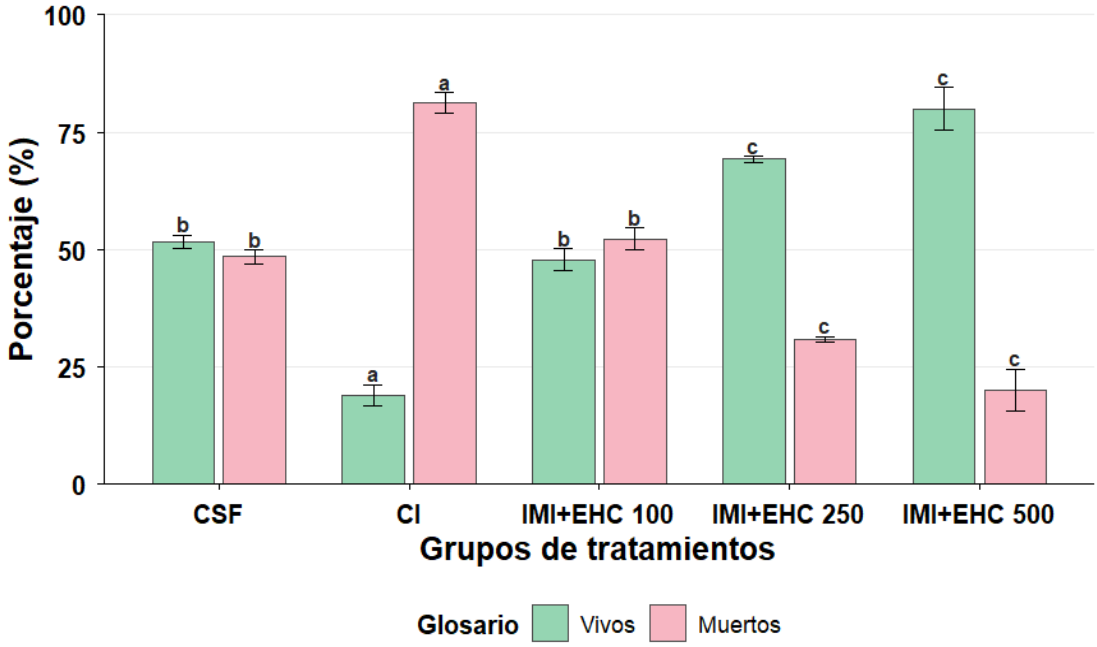


Figura 6. Efectos del IMI y EHC sobre la vitalidad espermática. Las barras representan la media ± desviación estándar de la media del porcentaje de espermatozoides vivos y muertos. Letras distintas sobre las barras de una misma variable indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (prueba de Tukey HSD, $p < 0,05$, posterior a ANOVA de una vía); grupos que comparten al menos una letra no difieren significativamente entre sí.

5.1.3. Concentración espermática

En cuanto a la concentración espermática, el CSF presentó un valor de 9,55 ± 6,10 millones/mL, mientras que el CI mostró una disminución a 6,76 ± 4,00 millones/mL, reflejando el efecto adverso del tratamiento. En los grupos tratados con IMI más concentraciones crecientes de EHC (100, 250 y 500 mg/kg), se observó un aumento progresivo y dependiente de la dosis, alcanzando 14,41 ± 4,18; 22,15 ± 5,05; y 28,23 ± 3,36 millones/mL, respectivamente. Estos resultados indican que el tratamiento IMI + EHC, especialmente a la concentración más alta (EHC 500 mg/kg), no solo revierte la disminución observada en el CI, sino que supera claramente los niveles del CSF (Tabla 3 y Figura 7).

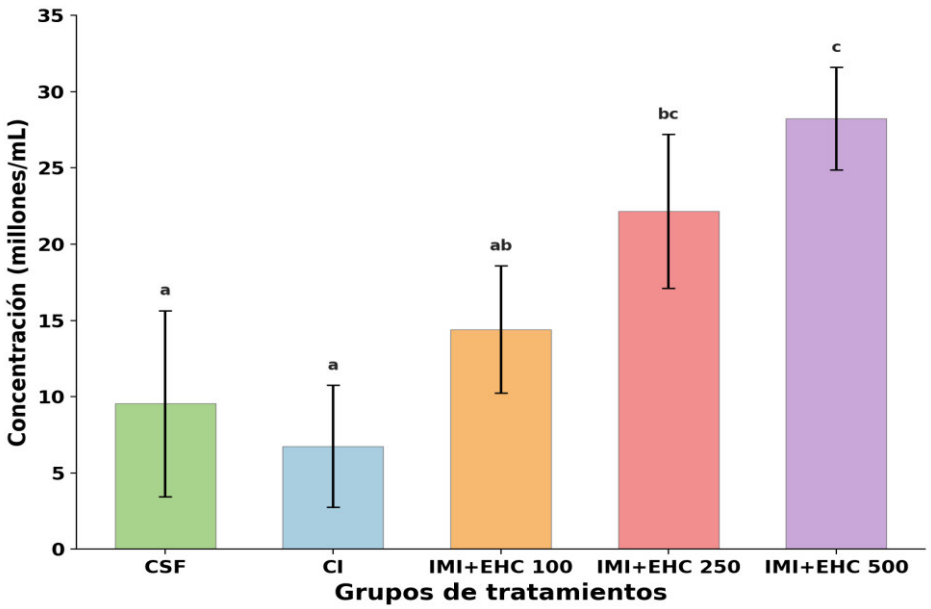


Figura 7. Efectos del IMI y EHC sobre la concentración espermática. Se evaluaron cinco grupos con diferentes tratamientos. Se consideró la unidad de medida millones/mL en una cámara de Neubauer a un aumento de 400X. Las barras representan la media ± desviación estándar de la media del porcentaje de concentración espermática. Letras distintas sobre las barras de una misma variable indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos

(prueba de Tukey HSD, $p < 0,05$, posterior a ANOVA de una vía); grupos que comparten al menos una letra no difieren significativamente entre sí.

5.2. Prueba de micronúcleos en MOR

En relación con el índice de genotoxicidad, el CSF presentó un valor de 8,76 ± 1,39, mientras que el CI mostró un incremento hasta 12,51 ± 1,26, lo que indica un aumento significativo del daño al material genético inducido por el tratamiento tóxico de IMI. En los grupos tratados con IMI más concentraciones crecientes de EHC (100, 250 y 500 mg/kg), se observó una disminución progresiva y dependiente de la dosis en el índice de genotoxicidad, con valores de 5,98 ± 0,79; 5,41 ± 0,64; y 4,21 ± 1,03, respectivamente. Estos resultados no solo son notablemente inferiores a los del CI, sino que también se encuentran por debajo del nivel basal del CSF. Esto sugiere que el tratamiento con EHC ejerce un efecto protector frente al daño genotóxico producto por IMI, reduciendo la frecuencia de alteraciones en el material genético de las células de la médula ósea roja de manera proporcional a la concentración utilizada, siendo el grupo IMI + EHC 500 mg/kg el que alcanza el menor nivel de genotoxicidad.

Tabla 4. Promedios ± desviación estándar del Índice de genotoxicidad, por grupo de tratamiento.

Grupo de tratamiento	Índice de genotoxicidad
CSF	8,76 ± 1,39
CI	12,51 ± 1,26
IMI + EHC 100	5,98 ± 0,79
IMI + EHC 250	5,41 ± 0,64
IMI + EHC 500	4,21 ± 1,03

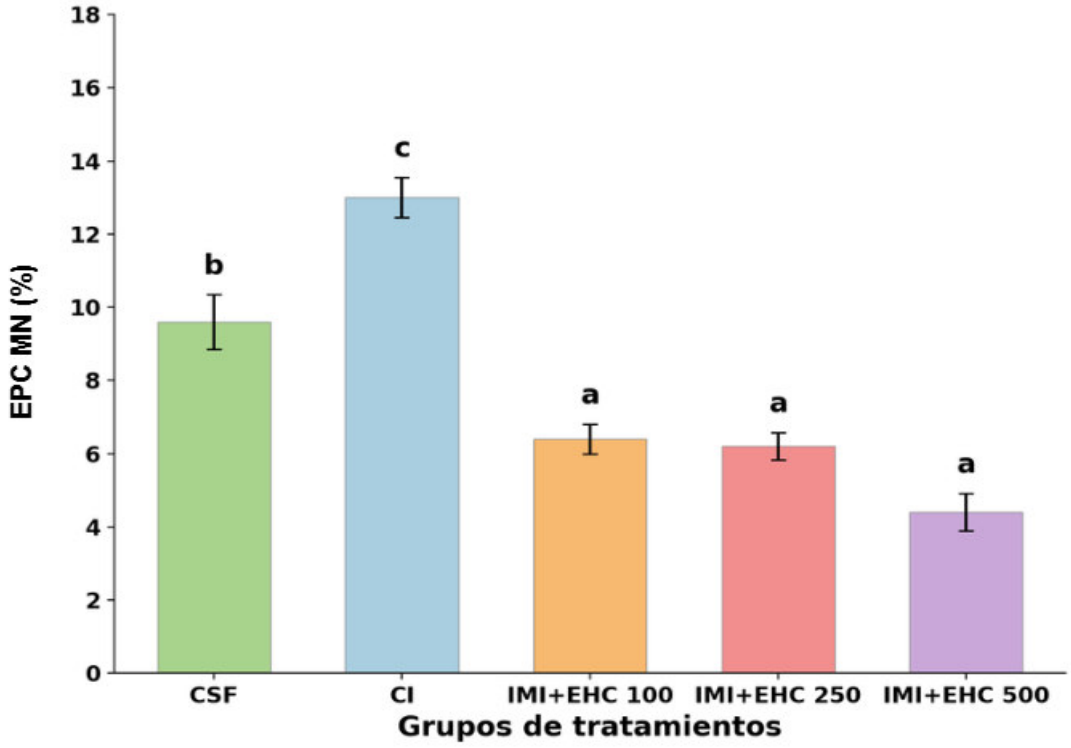


Figura 8. Índice de genotoxicidad en MOR. Se evaluaron EPC con presencia de MN haciendo uso de la tinción Giemsa. Observación a un aumento de 1000X. Letras distintas sobre las barras de una misma variable indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos (prueba de Tukey HSD, $p < 0,05$, posterior a ANOVA de una vía); grupos que comparten al menos una letra no difieren significativamente entre sí.

6. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto protector del EHC frente a la toxicidad inducida por IMI, un insecticida neonicotinoide de uso masivo en la agricultura mundial, representando el 25 % del total de insecticidas usados (Bass et al., 2015). Su presencia no solo se limita al entorno agrícola, ya que pueden alcanzar a la población general a través de los alimentos. Su exposición se ha relacionado tanto con daño al sistema reproductor, afectando la fertilidad, como con efecto genotóxico sobre la médula ósea roja. Por ello, resulta relevante identificar compuestos naturales que mitiguen dichos efectos.

A través de dos pruebas complementarias (espermatograma y prueba de micronúcleos en MOR), los resultados demuestran que el EHC ejerce un efecto protector, con capacidad de revertir parcial o totalmente el daño inducido por IMI. Los resultados del espermatograma confirman que el CI induce un efecto adverso significativo sobre la calidad espermática, evidenciado por la disminución de la motilidad progresiva, vitalidad y concentración espermática en comparación con el EHC. Estos hallazgos coinciden con reportes previos que atribuyen al IMI la generación de estrés oxidativo y apoptosis en células germinales. Por ejemplo, Hafez et al. (2016) demostraron que la intoxicación con IMI aumenta las ROS dañando las células testiculares y alterando enzimas clave para el metabolismo hormonal, incluyendo la LH y, en consecuencia, la testosterona, esencial para la espermatogénesis. Asimismo, Golamreza et al. (2010) observaron hipertrofia de las células de Leydig, alteraciones en la morfología y viabilidad espermática tras exposición a IMI, también se observó una baja densidad de espermatozoides y una disminución de la testosterona en

pruebas con IMI (Zhao et al., 2021). Un hallazgo novedoso de este estudio es la recuperación progresiva de los parámetros espermáticos con tratamiento de EHC. En particular, la dosis más alta (EHC 500 mg/kg) no sólo revirtió el daño inducido por IMI, sino que superó los valores del CSF. Esto sugiere que *Myrciaria dubia* influye en la fertilidad gracias a su contenido rico en vitamina C y a la presencia de polifenoles como las antocianinas (Da Silva et al., 2012; Grigio et al., 2017), actúa como un agente protector y restaurador de la funcionalidad espermática, probablemente al neutralizar el estrés oxidativo (Inoue et al., 2008) y proteger el ADN espermático. Cabe destacar que la motilidad progresiva alcanzó un 76,2 % con EHC 500 mg/kg, valor notablemente superior al 31,4 % del CSF. Esto podría indicar un efecto estimulante del EHC en condiciones no tóxicas, hipótesis que requiere ser confirmada en estudios futuros con controles adicionales de EHC solo.

La prueba de MN en MOR confirmó la capacidad genotóxica del IMI. El grupo CI mostró un incremento significativo en el índice de micronúcleos (12,51 %) en comparación con el CSF (8,76 %), lo que indica que la exposición a IMI induce daño cromosómico o alteraciones en las células hematopoyéticas (Iturburu et al., 2018). Este hallazgo es consistente con reportes previos que asocian a los neonicotinoides con la generación de ROS y estrés oxidativo, los cuales pueden provocar roturas del ADN y formación de MN (Ilyushina et al., 2020; Roy et al., 2017; Wang et al., 2018). Se halló un menor índice genotóxico al incluir en los tratamientos EHC, esto posiblemente se deba al efecto protector de los antioxidantes de *Myrciaria dubia* (de Azevêdo et al., 2014). El mecanismo de

protección de *Myrciaria dubia* no se limita al tracto reproductivo, sino que opera a nivel sistémico, ya que, la médula ósea es un tejido hematopoyético.

Relación entre los parámetros del espermatograma y el índice de genotoxicidad

Al integrar ambas pruebas, se observa una correlación inversa fuerte y consistente entre el índice de genotoxicidad y la calidad espermática. Los grupos con menor daño genotóxico (IMI + EHC 500 mg/kg: 4,21) presentan la mayor motilidad progresiva (76,2 %), vitalidad (80,0 %) y concentración (28,23 millones/mL). Por el contrario, el control imidacloprid, con el índice más alto de MN (12,51), no muestra resultados alentadores en el espermatograma. No obstante, la recuperación en la concentración espermática (de 6,76 a 28,23 millones/mL) es incluso mayor que la reducción del daño genotóxico, lo que sugiere que EHC podría también influir en procesos no genotóxicos como la proliferación celular, la diferenciación o la supervivencia de espermatogonias.

7. CONCLUSIONES

- La administración de IMI produce un efecto genotóxico en las células hematopoyéticas de la MOR, demostrado por el aumento de MN.
- La administración de IMI produce un efecto citotóxico en los espermatozoides, demostrado por resultados del espermatograma.
- La administración del EHC a una concentración de 500 mg/kg produce una reducción del índice de micronúcleos en las células hematopoyéticas de la MOR.

- La administración del EHC a una concentración de 500 mg/kg mejora los parámetros espermáticos evaluados sometidos a tratamientos con el IMI.

8. RECOMENDACIONES

- Se debería considerar en una próxima experimentación aumentar el número de muestra a evaluar con el fin de obtener aún mejores resultados.
- Se recomienda validar estos hallazgos en otros tejidos sensibles como el hígado o el riñón.
- Se requiere de grupos controles adicionales con EHC para confirmar si el EHC posee un efecto bioestimulante basal independiente.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, J., & Souza, F. (2015). Antioxidants, Chemical Composition and Minerals in Freeze-Dried Camu-Camu (*Myrciaria dubia*) (H.B.K.) Mc Vaugh) Pulp. *Food and Nutrition Sciences*, 6(10), 869-874. https://doi.org/10.4236/fns.2015.610091

Akter, S., Oh, S., Eun, J.-B., & Ahmed, M. (2011). Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia)* fruit: A review. *Food Research International*, 44(7), 1728-1732. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.045

Ángel, A. N., López Serrano, F. A., Paggi, Y., & Segade, G. (2015). *Evaluación de sustentabilidad a nivel ambiental y socioeconómico de diferentes*

estrategias fitosanitarias en el cultivo de los cítricos (zona norte, provincia de Buenos Aires) [V Congreso Latinoamericano de Agroecología – SOCLA, La Plata]. http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/54414

Arellano-Acuña, E., Rojas-Zavaleta, I., & Paucar-Menacho, L. (2016). Camu-camu (*Myrciaria dubia*): Tropical fruit of excellent functional properties that help to improve the quality of life. *Scientia Agropecuaria*, 7, 433-443. https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2016.04.08

Arencibia, D. F., Rosario, L. A., Morffi, J., & Curveco, D. (2009). Desarrollo y estandarización de la técnica en tres ensayos de genotoxicidad. *Retel*, 25(3), 22-38. https://www.sertox.ar/wp-content/uploads/2020/01/25003.pdf

Avello, M., & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 494, 161-172. https://doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010

Bal, R., Naziroglu, M., Turk, G., Yilmaz, O., Kuloglu, T., et al. (2012a). Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function,* 30(6), 492-499. https://doi.org/10.1002/cbf.2842

Bal, R., Turk, G., Tuzcu, M., Yilmaz, O., Kuloglu, T., et al. (2012b). Assessment of imidacloprid toxicity on reproductive organ system of adult male rats.

Journal of Environmental Science and Health: Part B, 47(5), 434-444. https://doi.org/10.1080/03601234.2012.659187

Bagri, P., Kumar, V., & Sikka, A. K. (2015). An in vivo assay of the mutagenic potential of imidacloprid using sperm head abnormality test and dominant lethal test. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(3), 342-348. https://doi.org/10.3109/01480545.2014.966832

Bagri, P., Kumar, V., & Sikka, A. K. (2016). Assessment of imidacloprid-induced mutagenic effects in somatic cells of Swiss albino male mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 39(4), 412-417. https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1137301

Bass, C., Denholm, I., Williamson, M. S., & Nauen, R. (2015). The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology, Insecticide and Acaricide Modes of Action and their Role in Resistance and its Management*, 121, 78-87. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.04.004

Bieniek, J. M., & Lo, K. C. (2016). Recent advances in understanding & managing male infertility. *F1000Research*, 5, 2756. https://doi.org/10.12688/f1000research.9375.1

Burke, A. P. (2016). *A neurodevelopmental study of mice following in utero and early postnatal exposure to imidacloprid, a neonicotinoid pesticide* [Tesis de doctorado, University of Toronto].

Campos-Correa, K. E., & Gutiérrez-Landa, C. J. (2018). Actividad estrogénica del extracto hidroalcohólico del fruto de aguaje *Mauritia flexuosa l* en ratas ovariectomizadas. *Revista Peruana de Investigación Materno Perinatal*, *2*(1), 14-18. https://doi.org/10.33421/inmp.201314

Carson, S. A., & Kallen, A. N. (2021). Diagnosis and Management of Infertility. *JAMA*, 326(1), 65-76. https://doi.org/10.1001/jama.2021.4788

Castro, J. C., Maddox, J. D., Cobos, M., & Imán, S. A. (2018). *Myrciaria dubia* "Camu Camu" Fruit: Health-Promoting Phytochemicals and Functional Genomic Characteristics. In Breeding and Health Benefits of Fruit and Nut Crops. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.73213

Chagas, E. A., Bacelar-Lima, C. G., Carvalho, A., Ribeiro, M. I. G., Sakazaki, R. T., & Neves, L. C. (2012). Propagação do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mcvaugh). *REVISTA AGRO@MBIENTE ON-LINE*, 6(1), 67-73. https://doi.org/10.18227/1982-8470ragro.v6i1.634

Chen, M., Tao, L., McLean, J., & Lu, C. (2014). Quantitative Analysis of Neonicotinoid Insecticide Residues in Foods: Implication for Dietary Exposures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), 6082-6090. https://doi.org/10.1021/jf501397m

Cheng, C. Y., & Mruk, D. D. (2010). A local autocrine axis in the testes that regulates spermatogenesis. *Nature Reviews Endocrinology*, 6(7), 380-395. https://doi.org/10.1038/nrendo.2010.71

Christin-Maitre, S., & Young, J. (2022). Androgens and spermatogenesis. *Annales D'endocrinologie*, 83(3), 155-158. https://doi.org/10.1016/j.ando.2022.04.010

Clouthier, D. E., Avarbock, M. R., Maika, S. D., Hammer, R. E., & Brinster, R. L. (1996). Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*, 381, 418-421. https://doi.org/10.1038/381418a0

Costa, C., Silvari, V., Melchini, A., Catania, S., Heffron, J. J., Trovato, A., & De Pasquale, R. (2009). Genotoxicity of imidacloprid in relation to metabolic activation and composition of the commercial product. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(1), 40-44. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.018

Costa, A. G. V., Garcia-Diaz, D. F., Jimenez, P., & Silva, P. I. (2013). Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red–black berries. *Journal of Functional Foods*, 5(2), 539-549. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.01.029

Crosby, E. B., Bailey, J. M., Oliveri, A. N., & Levin, E. D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology,* 49, 81-90. https://doi.org/10.1016/j.ntt.2015.05.004

Da Silva, F. C., Arruda, A., Ledel, A., Dauth, C., Romão, N. F., Viana, R. N., De Barros Falcão Ferraz, A., Picada, J. N., & Pereira, P. (2012). Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu–

camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(7), 2275-2281. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.021

Daraghmeh, A., Shraim, S., Abulhaj, R., & Sansour, J. (2007). Imidacloprid residues in fruits, vegetables and water samples from Palestine. *Environmental Geochemistry and Health,* 29(1), 45-50. https://doi.org/10.1007/s10653-006-9070-7

De Azevêdo, J., Fujita, A., de Oliveira, E. L., Genovese, M. I., & Correia, R. (2014). Residuos industriales secos de camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK McVaugh): Un polvo amazónico rico en compuestos bioactivos con atributos funcionales. *Food Research International*, 62, 934-940. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.018

De Kretser, D., Loveland, K., Meinhardt, A., Simorangkir, D., & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human reproduction*, 13*(1)*, 1-8. https://doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.1

Durairajanayagam, D., Agarwal, A., Ong, C., & Prashast, P. (2014). Lycopene and male infertility. *Asian Journal of Andrology*, 16(3), 420-425. https://doi.org/10.4103/1008-682X.126384

Endo, T., Freinkman, E., De Rooij, D. G., & Page, D. C. (2017). Periodic production of retinoic acid by meiotic and somatic cells coordinates four transitions in mouse spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(47), 1-10. https://doi.org/10.1073/pnas.1710837114

Fernandez-Alba, A. R., Valverde, A., Agüera, A., Contreras, M., & Chiron, S. (1996). Determination of imidacloprid in vegetables by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A,* 721(1), 97-105. https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00882-5

Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico & Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica. (2009). *Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal*. Chile. Recuperado de: https://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2012/10/Libro-4-Aspectos-Bio%C3%A9ticos-de-la-Experimentaci%C3%B3n-Animal.pdf

Food and Agriculture Organization. (2001). *Pesticide residues in food*. Recuperado de: https://openknowledge.fao.org/items/3c2206f3-ac09-4148-b396-c3ddde321064

Food and Agriculture Organization. (2008). *Specifications and evaluations for agricultural pesticides*. Recuperado de: https://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Imidacloprid08.pdf

Fujita, A., Borges, K., Correia, R., Franco, B. D. G. D. M., & Genovese, M. I. (2013). Impact of spouted bed drying on bioactive compounds, antimicrobial and antioxidant activities of commercial frozen pulp of camu-camu (*Myrciaria dubia* Mc. Vaugh). *Food Research International*, 54(1), 495-500. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.07.025

García-Chacón, J. M., Marín-Loaiza, J. C., & Osorio, C. (2023). Camu Camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh): An Amazonian Fruit with Biofunctional Properties–A Review. ACS *Omega*, 8(6), 5169-5183. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07245

Golamreza, N., Mazdak, R., Aref, H., Simineh, S., & Sajad, F. (2010). The Effect of Chronic Exposure with Imidacloprid Insecticide on Fertility in Mature Male Rats. *International Journal of Fertility and Sterility*, 4(1), 9-16. https://www.ijfs.ir/article_45815_533aa9666119d578b635c3bdba609070.pdf

Golbamaki, N., Rasulev, B., Cassano, A., Marchese Robinson, R. L., Benfenati, E., Leszczynski, J., & Cronin, M. T. D. (2015). Genotoxicity of metal oxide nanomaterials: Review of recent data and discussion of possible mechanisms. *Nanoscale*, *7*(6), 2154-2198. https://doi.org/10.1039/C4NR06670G

Gonzáles, L., Aylas, B., Paima, K., & Bazán, A. (2013). Determinación de la tasa respiratoria de *Eugenia stipitata* Mc Vaugh (arazá) y *Myrcyaria dubia* HBK (camu-camu). *Ciencia Amazónica (Iquitos)*, 3(1), 53-58. https://doi.org/10.22386/ca.v3i1.52

Grigio, M. L., Alves Chagas E., Rathinasabapathi B., Cardoso Chagas P., Raniely Vieira Da Silva A., Thiely Moreira S., & Rodrigues De Oliveira R. (2017). Qualitative evaluation and biocompounds present in different parts of

camu-camu (*Myrciaria dubia)* fruit. *African Journal of Food Science*, 11(5), 124-129. https://doi.org/10.5897/AJFS2016.1574

Hafez, E. M., Issa, S. Y., Mazroua, M. K. A., Ibrahim, K. T., & Rahman, S. M. A. (2016). The Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid: A Male Reproductive System Toxicity Inducer-Human and Experimental Study. *Toxicology: Open Access*, 2(01). https://doi.org/10.4172/2476-2067.1000109

Hayashi, M. (2016). The micronucleus test—Most widely used in vivo genotoxicity test—. *Genes and Environment*, 38(1), 18. https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x

Hayes, J., Doherty, A. T., Adkins, D. J., Oldman, K., & O'Donovan, M. R. (2009). The rat bone marrow micronucleus test--study design and statistical power. *Mutagenesis*, 24(5), 419–424. https://doi.org/10.1093/mutage/gep024

Ibtisham, F., Wu, J., Xiao, M., An, L., Banker, Z., Nawab, A., Zhao, Y., & Li, G. (2017). Progress and future prospect of in vitro spermatogenesis. *Oncotarget*, 8(39), 66709-66727. https://doi.org/10.18632/oncotarget.19640

Ilyushina, N. A., Egorova, O. V., Masaltsev, G. V., Averianova, N. S., Revazova, Y. A., Rakitskii, V. N., Goumenou, M., Vardavas, A., Stivaktakis, P., & Tsatsakis, A. (2020). Genotoxicity of mixture of imidacloprid, imazalil and tebuconazole. *Toxicology Reports*, 7, 1090-1094. https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.08.021

Inoue, T., Komoda, H., Uchida, T., & Node, K. (2008). La fruta tropical camu-camu (*Myrciaria dubia*) tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. *Journal of Cardiology*, 52(2), 127-132. https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2008.06.004

Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. (2021). MEMORIA INSTITUCIONAL DEL IIAP - 2021. https://www.gob.pe/institucion/iiap/informes-publicaciones/3873003-memoria-institucional-2021

Instituto Nacional de Salud. (2010). Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Lima. Recuperado de https://hdl.handle.net/20.500.14196/117

Iturburu, F. G., Simoniello, M. F., Medici, S., Panzeri, A. M., & Menone, M. L. (2018). Imidacloprid Causes DNA Damage in Fish: Clastogenesis as a Mechanism of Genotoxicity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100(6), 760-764. https://doi.org/10.1007/s00128-018-2338-0

Jactel, H., Verheggen, F., Thiéry, D., Escobar-Gutiérrez, A. J., Gachet, E., & Desneux, N. (2019). Alternatives to neonicotinoids. *Environment International*, 129, 423-429. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.045

Jain, A. K., & Pandey, A. K. (2019). In Vivo Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 2031, 135–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_7

Justi, K. C., Visentainer, J. V., Evelázio de Souza, N., & Matsushita, M. (2000). Nutritional composition and vitamin C stability in stored camu-camu (*Myrciaria dubia*) pulp. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(4), 405-408. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0004-06222000000400014&lng=es&nrm=iso&tlng=en

Kang, S. H., Kwon, J. Y., Lee, J. K., & Seo, Y. R. (2013). Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. *Journal of Cancer Prevention*, 18(4), 277-288. https://doi.org/10.15430/JCP.2013.18.4.277

Kapoor, U., Srivastava, M. K., & Srivastava, L. P. (2011). Toxicological impact of technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food and Chemical Toxicology*, 49(12), 3086-3089. https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.09.009

Karabay, N. U., & Oguz, M. G. (2005). Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos. *Genetics and Molecular Research*, 4(4), 653-652. https://geneticsmr.com/wp-content/uploads/2024/04/4-4-gmr0134.pdf

Lari, S., Vanka, J., Jee, B., Pandiyan, A., Yamagani, P., Kumar, S. B., Naidu, M., & Jonnalagadda, P. (2023). Mitigation of pesticide residue levels in the exposed dermal regions of occupationally exposed farmworkers by use of personal protective equipment. *Frontiers in Public Health*, 11, 1232149. https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1232149

Liu, J., Song, S., Zhang, L., Qu, Y., Zhao, Y., et al. (2004). Analysis of residues of imidacloprid in tobacco by high-performance liquid chromatography with liquid-liquid partition cleanup. *Pest Management Science,* 61(5), 511-514. https://doi.org/10.1002/ps.819

Lonare, M., Kumar, M., Raut, S., Badgujar, P., Doltade, S., & Telang, A. (2014). Evaluation of imidacloprid-induced neurotoxicity in male rats: A protective effect of curcumin. *Neurochemistry International,* 78, 122-129. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2014.09.003

Luzhna, L., Kathiria, P., & Kovalchuk, O. (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment: From genetics to epigenetics and beyond. *Frontiers in Genetics*, 4, 131. https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00131

Matheus Lobo, T., & Bolaños, A. (2014). Micronúcleos: Biomarcador de genotoxicidad en expuestos a plaguicidas. *Salus*, 18(2), 18-26. https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1316-71382014000200005&script=sci_arttext

Matsuda, K., Buckingham, S. D., Kleier, D., Rauh, J. J., Grauso, M., & Sattelle, D. B. (2001). Neonicotinoids: Insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, *22*(11), 573-580. https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01820-4

Mikolić, A. & Karačonji, I. (2018). Imidacloprid as reproductive toxicant and endocrine disruptor: investigations in laboratory animals. *Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju,* 69. 10.2478/aiht-2018-69-3144

Ministerio de Agricultura y Riego del Perú. (2024). *Estadísticas del Sector Agrícola*. Recuperado de www.minagri.gob.pe

Miyamoto, T., Tsujimura, A., Miyagawa, Y., Koh, E., Namiki, M., & Sengoku, K. (2012). Male Infertility and Its Causes in Human. *Advances in Urology*, *2012*, 1-7. https://doi.org/10.1155/2012/384520

Mohamed, S., Sabita, U., Rajendra, S., & Raman, D. (2017). Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Science*, *1*(5). 10.19080/GJPPS.2017.02.555575

Mohapatra, S., Deepa, M., Lekha, S., Nethravathi, B., Radhika, B., & Gourishanker, S. (2012). Residue dynamics of spirotetramat and imidacloprid in/on mango and soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* 89, 862-867. https://doi.org/10.1007/s00128-012-0735-2

Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 157-177. https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025

Nabiuni, M., Parivar, K., Noorinejad, R., Falahati, Z., Khalili, F., & Karimzadeh, L. (2015). The reproductive side effects of Imidacloprid in pregnant Wistar rat. *International Journal of Cellular and Molecular Biotechnology*, 2015(1), 10-18. https://doi.org/10.5899/2015/ijcmb-00017

Nauen, R., & Denholm, I. (2005). Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: Current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 58(4), 200-215. https://doi.org/10.1002/arch.20043

Neto, F. T. L., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S., & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*, 59, 10-26. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.04.009

Pantoja, M. D., & Alba, J. C. R. (2015). Células Madre Hematopoyéticas: Origen, diferenciación y función. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 15(1), 29-37. https://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2015/muv151d.pdf

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

Renteria, J. C. B., Mauricio-Sandoval, E. A., Espinoza-Espinoza, L. A., Cornelio-Santiago, H. P., Moreno-Quispe, L. A., & Portalatino, E. J. V. (2022). Antimicrobial potential of camu camu (*Myrciaria dubia*) against bacteria, yeasts, and parasitic protozoa: A review. *Revista Facultad Nacional de*

Agronomía Medellín, 75(2), 9989-9998. https://doi.org/10.15446/rfnam.v75n2.98010

Roy, P., Phukan, P. K., Changmai, D., & Boruah, S. (2017). Pesticides, insecticides and male infertility. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, 6(8), 3387. https://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20173448

Sarandon, R. (2002). Incorporando el enfoque agroecológico en las Instituciones de Educación Agrícola Superior: la formación de profesionales para una agricultura sustentable. *Agroecología e Desenvolvimiento Rural Sustentavel*, 3(2), 40-48.

Schlatt, S., & Ehmcke, J. (2014). Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Regulation of Spermatogenesis & Nuclear envelope proteins in health and diseases*, 29, 2-16. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.007

Sharma, R., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: An Overview. *Sperm Chromatin,* 19-44. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6857-9_2

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., … Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution*

Research International, *22*(1), 5-34. https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y

Sofikitis, N., Giotitsas, N., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Giannakis, D., & Pardalidis, N. (2008). Hormonal regulation of spermatogenesis and spermiogenesis. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 109(3-5), 323–330. https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.004

Soumis, N. (2018). NEONICOTINOIDS: A THREAT TO BIODIVERSITY, ECOSYSTEM SERVICES, & FOOD SECURITY. *Association of Physicians for the Environment*, 4-12. https://archives.equiterre.org/sites/fichiers/neonic_primer_final_18_juillet_2018_0.pdf

Sur, A., & Stork, A. (2003). Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. *Bulletin of Insectology,* 56, 35-40. http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol56-2003-035-040sur.pdf

Tokumoto, J., Danjo, M., Kobayashi, Y., Kinoshita, K., & Omura, T. (2013). Genotoxicity of neonicotinoid insecticides imidacloprid and acetamiprid in multiple human cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 23*(12), 3049-3053. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.04.007

Tomizawa, M., & Casida, J. (2005). Neonicotinoid Insecticide Toxicology: Mechanism of Selective Action. *Annual Review of Pharmacological*

Toxicology, 45, 247-268. https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930

Udroiu, I., & Sgura, A. (2016). Genotoxic sensitivity of the developing hematopoietic system. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 767, 1-7. https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.001

Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar.* 31(2), 126-133. http://examtimeassets.s3.amazonaws.com/uploads/media/pdf_media/12568047/d329fa54-06e5-4b34-89b7-934df6688641.pdf

Wang, X., Anadón, A., Wu, Q., Qiao, F., Ares, I., Martínez-Larrañaga, M.-R., Yuan, Z., & Martínez, M.-A. (2018). Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 58(1), 471-507. https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052429

Woods, E. J., Benson, J. D., Agca, Y., & Critser, J. K. (2004). Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48(2), 146-156. https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2004.03.002

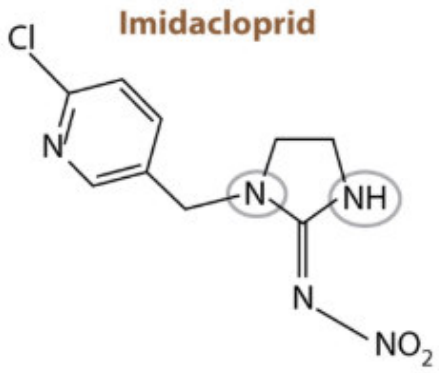
World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. Recuperado de: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/343208/9789240030787-eng.pdf?sequence=1

World Health Organization. (2025). *Infertility*. Recuperado de: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility

Zhao, G., Li, J., Yang, F., Yin, X., Ren, F., Fang, B., & Pang, G. (2021). Spermiogenesis toxicity of imidacloprid in rats, possible role of CYP3A4. *Chemosphere*, *282*, 131120. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131120

ANEXOS

Anexo 1. Estructura química del Imidacloprid Wang et al. (2018).



Anexo 2. Prueba de Shapiro - Wilk para cada variable.

Variable	Grupo de tratamiento	W	p
Motilidad progresiva	CSF	0,8525	0,2026
	CI	0,7008	**0,0098**
	IMI + EHC 100	0,9993	0,9998
	IMI+ EHC 250	0,8937	0,3761
	IMI+ EHC 500	0,9733	0,8961
Motilidad no progresiva	CSF	0,9917	0,9854
	CI	0,9787	0,9276
	IMI + EHC 100	0,8228	0,1227

	IMI+ EHC 250	0,7624	**0,0386**
	IMI+ EHC 500	0,8707	0,2693
Inmóviles	CSF	0,9001	0,4104
	CI	0,902	0,4211
	IMI + EHC 100	0,796	0,0751
	IMI+ EHC 250	0,9609	0,814
	IMI+ EHC 500	0,8962	0,3894
Vivos	CSF	0,9245	0,5597
	CI	0,9784	0,926
	IMI + EHC 100	0,952	0,7514
	IMI+ EHC 250	0,902	0,4211
	IMI+ EHC 500	0,9687	0,8666
Concentración	CSF	0,876	0,2917
	CI	0,7178	**0,0146**
	IMI + EHC 100	0,8277	0,1338
	IMI+ EHC 250	0,9011	0,4158
	IMI+ EHC 500	0,9616	0,8189

EPC MN	CSF	0,881	0,314
	CI	0,8327	0,1458
	IMI + EHC 100	0,7709	**0,046**
	IMI+ EHC 250	0,881	0,314
	IMI+ EHC 500	0,9609	0,814

Nota. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk. La mayoría de las variables presentaron distribución normal ($p > 0.05$); sin embargo, los valores en negrita indican falta de normalidad ($p \leq 0.05$).

Anexo 3. Prueba de Levene para cada variable

Variable	F	p
Motilidad progresiva	2,25	0,1
Motilidad no progresiva	1,14	0,37
Inmóviles	0,6	0,67
Vivos	1,54	0,23
Concentración Espermática	0,52	0,72
EPC MN	0,4	0,8

Nota. Prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de varianzas, con un nivel de significancia $p < 0,05$. Todas las variables cumplieron con el supuesto ($p > 0,05$).

Anexo 4. Prueba de ANOVA de una vía para cada variable

Variable	F	p
Motilidad Progresiva	139,79	$p < 0,001$
Motilidad No Progresiva	31,86	$p < 0,001$
Inmóviles	112,92	$p < 0,001$
Vivos	82,46	$p < 0,001$
Concentración Espermática	10,07	$p < 0,001$
EPC MN	40,75	$p < 0,001$

Nota. El análisis estadístico indica que el imidacloprid y el extracto hidroalcohólico de camu-camu ejercen un efecto significativo ($p < 0,05$) sobre los parámetros de calidad espermática y genotoxicidad en los grupos experimentales.

Anexo 5. Prueba de Tukey HSD

Motilidad progresiva

Comparación	Dif. medias	IC 95 % inf.	IC 95 % sup.	p-valor ajustado
CI vs. CSF	-21,4	-30,269	-12,531	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 100	-38	-46,869	-29,131	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 250	-43,4	-52,269	-34,531	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 500	-66,2	-75,069	-57,331	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 100	-16,6	-25,469	-7,731	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 250	-22	-30,869	-13,131	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 500	-44,8	-53,669	-35,931	p < 0,001
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 250	-5,4	-14,269	3,469	0,389
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 500	-28,2	-37,069	-19,331	p < 0,001
IMI+EHC 250 vs. IMI+EHC 500	-22,8	-31,669	-13,931	p < 0,001

Motilidad no progresiva

Comparación	Dif. medias	IC 95 % inf.	IC 95 % sup.	p-valor ajustado
CI vs. CSF	-28,4	-38,139	-18,661	p < 0,001

CI vs. IMI+EHC 100	-8,4	-18,139	1,339	0,112
CI vs. IMI+EHC 250	-12,2	-21,939	-2,461	0,009
CI vs. IMI+EHC 500	5,4	-4,339	15,139	0,479
CSF vs. IMI+EHC 100	20	10,261	29,739	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 250	16,2	6,461	25,939	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 500	33,8	24,061	43,539	p < 0,001
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 250	-3,8	-13,539	5,939	0,769
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 500	13,8	4,061	23,539	0,003
IMI+EHC 250 vs. IMI+EHC 500	17,6	7,861	27,339	p < 0,001

Inmóviles

Comparación	**Dif. medias**	**IC 95 % inf.**	**IC 95 % sup.**	**p-valor ajustado**
CI vs. CSF	49,8	40,083	59,517	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 100	46,4	36,683	56,117	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 250	55,6	45,883	65,317	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 500	60,8	51,083	70,517	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 100	-3,4	-13,117	6,317	0,83
CSF vs. IMI+EHC 250	5,8	-3,917	15,517	0,408
CSF vs. IMI+EHC 500	11	1,283	20,717	0,021

IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 250	9,2	-0,517	18,917	0,069
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 500	14,4	4,683	24,117	p < 0,001
IMI+EHC 250 vs. IMI+EHC 500	5,2	-4,517	14,917	0,513

Vivos

Comparación	**Dif. medias**	**IC 95 % inf.**	**IC 95 % sup.**	**p-valor ajustado**
CI vs. CSF	-32,8	-43,701	-21,899	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 100	-29	-39,901	-18,099	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 250	-50,4	-61,301	-39,499	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 500	-61,2	-72,101	-50,299	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 100	3,8	-7,101	14,701	0,832
CSF vs. IMI+EHC 250	-17,6	-28,501	-6,699	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 500	-28,4	-39,301	-17,499	p < 0,001
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 250	-21,4	-32,301	-10,499	p < 0,001
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 500	-32,2	-43,101	-21,299	p < 0,001
IMI+EHC 250 vs. IMI+EHC 500	-10,8	-21,701	0,101	0,053

Concentración Espermática

Comparación	Dif. medias	IC 95 % inf.	IC 95 % sup.	p-valor ajustado
CI vs. CSF	1,008	-9,666	11,682	0,998
CI vs. IMI+EHC 100	-3,848	-14,522	6,826	0,815
CI vs. IMI+EHC 250	-11,592	-22,266	-0,918	0,029
CI vs. IMI+EHC 500	-17,672	-28,346	-6,998	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 100	-4,856	-15,53	5,818	0,658
CSF vs. IMI+EHC 250	-12,6	-23,274	-1,926	0,016
CSF vs. IMI+EHC 500	-18,68	-29,354	-8,006	p < 0,001
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 250	-7,744	-18,418	2,93	0,23
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 500	-13,824	-24,498	-3,15	0,007
IMI+EHC 250 vs. IMI+EHC 500	-6,08	-16,754	4,594	0,454

Eritrocitos policrómaticos con micronúcleos

Comparación	Dif. medias	IC 95 % inf.	IC 95 % sup.	p-valor ajustado
CI vs. CSF	3,4	1,145	5,655	0,002
CI vs. IMI+EHC 100	6,6	4,345	8,855	p < 0,001
CI vs. IMI+EHC 250	6,8	4,545	9,055	p < 0,001

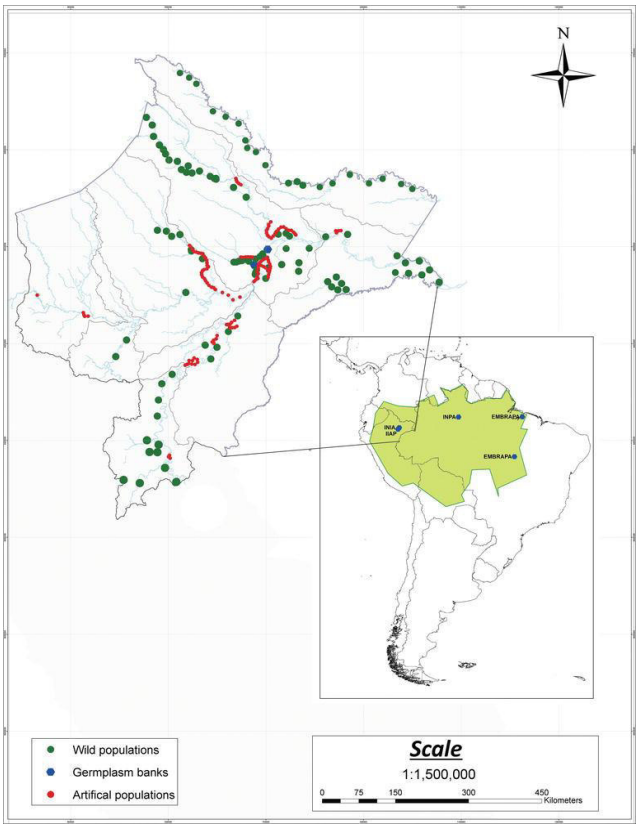
CI vs. IMI+EHC 500	8,6	6,345	10,855	p < 0,001
CSF vs. IMI+EHC 100	3,2	0,945	5,455	0,003
CSF vs IMI+EHC 250	3,4	1,145	5,655	0,002
CSF vs. IMI+EHC 500	5,2	2,945	7,455	p < 0,001
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 250	0,2	-2,055	2,455	0,999
IMI+EHC 100 vs. IMI+EHC 500	2	-0,255	4,255	0,098
IMI+EHC 250 vs. IMI+EHC 500	1,8	-0,455	4,055	0,159

Nota. Las comparaciones múltiples entre grupos se realizaron mediante la prueba post-hoc de Tukey HSD. Dif. medias corresponde a la diferencia entre las medias de los grupos comparados; IC 95% indica el intervalo de confianza al 95% de dicha diferencia; y p-valor ajustado representa el valor de p corregido por comparaciones múltiples según el método de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando p < 0,05.

Anexo 6. Fruto de *Myrciaria dubia*



Anexo 7. Distribución geográfica



Nota. Distribución geográfica de camu-camu en Sudamérica y en especial, en la región Loreto (Castro et al., 2018).

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° 129-2024-CBE-FCB-UNMSM

FECHA: 02 de abril del 2025

PROYECTO: "EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Mauritia flexuosa* (L.F. 1782) "AGUAJE" SOBRE LA GENOTOXICIDAD EN LAS CÉLULAS DE LA MÉDULA ÓSEA ROJA Y FERTILIDAD EN RATONES MACHO "*Mus musculus*" EXPUESTOS AL INSECTICIDA IMIDACLOPRID"

INVESTIGADOR SOLICITANTE: Bach. Nayelli Fiorella Rojas Coronel

TIPO DE PROYECTO: Proyecto de Tesis de Título

La Bach. Nayelli Fiorella Rojas Coronel, entregó al Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas una solicitud adjuntando toda la documentación completa el día 12 de diciembre del 2024, 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/1EKN6Ww7bX_3mTmFukHWNknSuJ92iOKod/edit?usp=sharing&ouid=104394135786257304126&rtpof=true&sd=true

En la reunión de fecha 02 de abril 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, 04 de abril del 2025

UNMSM Firmado digitalmente por LARA AMAT Y LEON Joan FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 08.04.2025 23:35:37 -05:00

Dr. JOAN LARA AMAT Y LEÓN
PRESIDENTE

UNMSM Firmado digitalmente por YAMASHIRO GUINOZA Carmen Rosario FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 05.04.2025 10:02:12 -05:00

BLGA. CARMEN YAMASHIRO GUINOZA
SECRETARIA

Email: comitebioetica.biologia@unmsm.edu.pe

Firmado digitalmente por AGUILAR LUNA Silvia Ysabel FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 02.12.2024 10:45:22 -05:00

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
FACULTAD/ DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lima, 02 de Diciembre del 2024

OFICIO N° 000492-2024-EPCB-FCB/UNMSM

Señorita
NAYELLI FIORELLA ROJAS CORONEL
Presente. -

Asunto: APROBACION PROYECTO DE TESIS.

De mi mayor consideración:

Tengo a bien dirigirme a usted, para expresarle mis cordiales saludos y, a la vez manifestarle que, los profesores designados como revisores del proyecto de tesis, han informado a esta dirección la conformidad.

En tal sentido, esta Dirección da por aprobado el Proyecto de Tesis titulado: **EFECTO PROTECTOR DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Mauritia flexuosa* (L.F. 1782) "AGUAJE" SOBRE LA GENOTOXICIDAD EN LAS CÉLULAS DE LA MÉDULA ÓSEA ROJA Y FERTILIDAD EN RATONES MACHO "*Mus Musculus*" EXPUESTOS AL INSECTICIDA IMIDACLOPRID;** para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **ZOOLOGÍA.**

Sin otro particular, me suscribo de usted.

SILVIA YSABEL AGUILAR LUNA
DIRECTORA (e) DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SAL/dta

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026- 2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: **https://spsgd.unmsm.edu.pe/verifica/inicio.do** e ingresando el siguiente código de verificación: **RFOYHIT**

Firmado digitalmente por AGUILAR LUNA Silvia Ysabel FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 23.06.2025 16:07:49 -05:00

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú. Decana de América
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Lima, 23 de Junio del 2025

OFICIO N° 000222-2025-EPCB-FCB/UNMSM

Señor Biólogo
JOSE LUIS RAFAEL PINO GAVIÑO
Asesor de Tesis
Presente. -

Asunto: ACEPTACION CAMBIO DE TITULO.

De mi mayor consideración:

Es grato dirigirme a usted, para saludarlo cordialmente y, al mismo tiempo manifestarle que esta dirección ha dado por aceptado el cambio del título de la tesis titulada **"Efecto protector del extracto hidroalcohólico de *Myrciaria dubia* en genotoxicidad y fertilidad de Ratones machos expuestos a imidacloprid"**; para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en **Zoología**, presentado por la Bach. **NAYELLI FIORELLA ROJAS CORONEL.**

Sin otro particular, sea propicia la oportunidad para reiterarle los sentimientos de mi especial consideración y estima personal.

SILVIA YSABEL AGUILAR LUNA
DIRECTORA (e) DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SAL/dta

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico archivado por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, aplicando lo dispuesto por el Art. 25 de D.S. 070-2013-PCM y la Tercera Disposición Complementaria Final del D.S. 026- 2016-PCM. Su autenticidad e integridad pueden ser contrastadas a través de la siguiente dirección web: **https://spsgd.unmsm.edu.pe/verifica/inicio.do** e ingresando el siguiente código de verificación: **OVYWSMX**