

2020

Efecto de la solución acuosa de "mashua" en la capacidad reproductiva de mus musculus machos y su implicancia en el desarrollo embrionario preimplantacional. Prueba preclínica

José Luis Rafael Pino Gavino

Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, jpinog@unmsm.edu.pe

José Gonzales Daga

Rafael Alvis Dávila

Roger Iziga Goicochea

Follow this and additional works at: <http://inicib.urp.edu.pe/rfmh>

Recommended Citation

Pino Gavino, José Luis Rafael; Gonzales Daga, José; Alvis Dávila, Rafael; and Iziga Goicochea, Roger (2020) "Efecto de la solución acuosa de "mashua" en la capacidad reproductiva de mus musculus machos y su implicancia en el desarrollo embrionario preimplantacional. Prueba preclínica," *Revista de la Facultad de Medicina Humana*: Vol. 20 : Iss. 4 , Article 21.

Available at: <http://inicib.urp.edu.pe/rfmh/vol20/iss4/21>

This Article is brought to you for free and open access by INICIB-URP. It has been accepted for inclusion in Revista de la Facultad de Medicina Humana by an authorized editor of INICIB-URP.



EFFECTO DE LA SOLUCIÓN ACUOSA DE "MASHUA" EN LA CAPACIDAD REPRODUCTIVA DE *MUS MUSCULUS* MACHOS Y SU IMPLICANCIA EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO PREIMPLANTACIONAL. PRUEBA PRECLÍNICA

EFFECT OF 'MASHUA' *Tropaeolum tuberosum* AQUEOUS EXTRACT IN SPERM QUALITY AND ITS IMPLICATION IN THE PREIMPLANTACIONAL DEVELOPMENT OF MOUSE EMBRYOS. PRE CLINIC TRIAL

José Gonzales-Daga^{1,a,b}, Rafael Alvis-Dávila^{2,a}, José Luis Rafael Pino-Gaviño^{1,a}, Roger Iziga-Goicochea^{1,a,c}

RESUMEN

Introducción: La "mashua", *Tropaeolum tuberosum*, es una especie vegetal nativa del Perú. Investigaciones realizadas han comprobado sus efectos sobre la fertilidad de mamíferos. **Objetivo:** Evaluar la acción biológica de la solución acuosa de *T. tuberosum* en el desarrollo de los embriones preimplantacionales de *Mus musculus* y la capacidad reproductiva de *Mus musculus* macho. **Métodos:** Estudio experimental preclínico de casos y controles. La muestra estuvo conformada por 32 ratones, el grupo casos lo conformó 24 ratones agrupados en tres grupos, cada uno de 8 ratones, a quienes se les administró extracto acuoso ad libitum, en una concentración de 50 g/Kg de peso corporal durante 8, 16 y 35 días respectivamente, el grupo control lo integró 8 ratones, quienes recibieron sólo agua de grifo. Cada grupo de machos se cruzaron con hembras de edad fértil, la presencia de tapón vaginal nos indicó el día 0 de desarrollo embrionario. A las 72 h se perfusionaron los cuernos uterinos y oviductos y se evaluó el grado de desarrollo, condición y morfología embrionaria preimplantacional de *Mus musculus* hasta alcanzar el estadio blastocisto. **Resultados:** Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de casos y control. Nuestros resultados demuestran que la administración de solución acuosa de *T. tuberosum* a ratones machos, altera la calidad reproductiva del ratón afectando la capacidad del embrión para desarrollarse normalmente hasta el estadio de blastocisto. **Conclusión:** El extracto acuoso de *Tropaeolum tuberosum* (mashua) afecta el desarrollo embrionario preimplantacional y la capacidad reproductiva en *Mus musculus* macho.

Palabras clave: Mashua; *Tropaeolum*; Dominancia fetal; Desarrollo preimplantacional (fuente: DeCS BIREME).

ABSTRACT

Introduction: The "mashua", *Tropaeolum tuberosum*, is a plant species native to Peru. Research carried out has proven its effects on the fertility of mammals. **Objective:** To evaluate the biological action of the aqueous solution of *T. tuberosum* in the development of preimplantation embryos of *Mus musculus* and the reproductive capacity of male *Mus musculus*. **Methods:** Preclinical experimental study of cases and controls. The sample consisted of 32 mice, the case group was made up of 24 mice grouped into three groups, each one of 8 mice, to whom aqueous extract was administered ad libitum, at a concentration of 50 g / Kg of body weight for 8, 16 and 35 days respectively, the control group consisted of 8 mice, who received only tap water. Each group of males were crossed with females of fertile age, the presence of a vaginal plug indicated day 0 of embryonic development. At 72 h the uterine horns and oviducts were perfused and the degree of development, condition and preimplantation embryonic morphology of *Mus musculus* were evaluated until reaching the blastocyst stage. **Results:** Statistically significant differences were found between the case and control groups. Our results show that the administration of aqueous solution of *T. tuberosum* to male mice alters the reproductive quality of the mouse, affecting the ability of the embryo to develop normally until the blastocyst stage. **Conclusion:** The aqueous extract of *Tropaeolum tuberosum* (mashua) affects preimplantation embryonic development and reproductive capacity in male *Mus musculus*.

Key words: Mashua; *Tropaeolum*; Fetal dominance; Preimplantational development (source: MeSH NLM).

¹ Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

² Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Universidad Científica del Sur, Panamericana Sur Km 19, Lima 42-Perú.

^a Biólogo.

^b Magister en Biología Molecular.

^c Phd en Ciencias Marinas.

Citar como: José Gonzales-Daga, Rafael Alvis-Dávila, José Luis Rafael Pino-Gaviño, Roger Iziga-Goicochea. Efecto de la solución acuosa de "Mashua" en la capacidad reproductiva de *Mus Musculus* machos y su implicancia en el desarrollo embrionario preimplantacional. Prueba preclínica. Rev. Fac. Med. Hum. Octubre 2020; 20(4):662-669. DOI 10.25176/RFMH.v20i4.3187

Journal home page: <http://revistas.urp.edu.pe/index.php/RFMH>

Artículo publicado por la Revista de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Ricardo Palma. Es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons: Creative Commons Attribution 4.0 International, CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con revista.medicina@urp.pe





INTRODUCCIÓN

Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), pertenece al grupo de tubérculos que crecen en la región andina, y ha sido utilizado desde tiempos muy antiguos como fuente de alimento y medicina por los nativos, y algunas de sus propiedades biológicas estarían relacionadas con ciertas sustancias como compuestos fenólicos, glucosinolatos, isotiocianatos y antocianinas^(1,2,3) Johns et al.⁽⁴⁾ sugiere un efecto antireproductivo de mashua en ratas macho debido a una caída del 45% de testosterona / dihidrotestosterona en muestras de sangre, sin mostrar ningún efecto sobre la capacidad de embarazar hembras de rata. Sin embargo, en otro estudio no se observaron diferencias en los niveles séricos de testosterona entre las ratas tratadas con un vehículo o mashua durante 42 días, pero se observó una reducción en el número de espermátides testiculares y la producción diaria de esperma del día 12 al día 42 del tratamiento. Debido a ello, los efectos hipotéticos de mashua estarían relacionados con la alteración de la función testicular al reducir el número, la producción diaria y afectar el tiempo de tránsito del esperma epididimario⁽⁵⁾.

En el estudio de Leiva-Revilla et al.⁽⁶⁾ se observó, en ratas macho tratadas con mashua, una disminución en la producción diaria de esperma y en el número de espermatozoides epididimarios y deferentes, así como una disminución en la motilidad de los espermatozoides; Por otro lado, mashua aumentó el porcentaje de morfología de esperma anormal y la tasa de tránsito de esperma epididimario. Estos efectos en ratas macho tratadas con mashua fueron reversibles después de 24 días de tiempo de recuperación. En otro estudio, los ratones tratados con un extracto hidroalcohólico de mashua mostraron una disminución en la motilidad progresiva de los espermatozoides y el recuento de espermatozoides en el epidídimo caudal, y un aumento en el recuento de espermatozoides inmóviles después de 21 días de tratamiento⁽⁷⁾. Los efectos antireproductivos de mashua estarían relacionados con el alto contenido de p-metoxibencil-glucosinolato, su transformación en isotiocianatos por la enzima mirosinasa intestinal y sus propiedades antiproliferativas y proapoptóticas^(8,9,5).

Por lo mencionado, el objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto del extracto acuoso de *T. tuberosum* en el desarrollo de los embriones preimplantacionales de *Mus musculus* y la capacidad reproductiva de *Mus musculus* macho.

MÉTODOS

Diseño y área de estudio

Estudio experimental preclínico de casos y controles, área de biología experimental.

Población y muestra

La muestra estuvo conformada por 32 ratones (*Mus musculus*), de la cepa albina suiza (Swiss Rockefeller), el grupo casos (experimental) lo conformó 24 ratones agrupados en tres grupos, cada uno de 8 ratones, a quienes se les administró extracto acuoso ad libitum, en una concentración de 50 g/Kg de peso corporal durante 8, 16 y 35 días respectivamente, el grupo control lo integró 8 ratones, quienes recibieron sólo agua de grifo. 24 ratones machos con 6-8 semanas de edad, se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (22-25°C) con ciclos de luz y oscuridad de 12 h, y se proporcionó agua y comida para ratones ad libitum.

Variables

Variables independientes: Sexo (macho, hembra), tratamiento ratones machos, hembras preñadas día 1 y día 4, peso hembras preñadas día 1 y día 4, presencia de cuerpo lúteo, número de embriones, grado embrionario, estadio del embrión.

Variables dependientes: calidad reproductiva del ratón macho, desarrollo embrionario preimplantacional.

Se realizó una ficha de recolección de datos con todas las variables del estudio de investigación donde se registraron los hallazgos encontrados.

Procedimientos

1. Preparación de extracto acuoso: Tubérculos de mashua se obtuvieron en fuentes comerciales (Lima, Perú) y se procesaron hasta obtener una pasta en el Instituto de Recursos Naturales, Facultad de Farmacología, en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

La pasta se disolvió en agua destilada (50 mg de pasta por ml) y se almacenó a 4° C hasta su uso.

2. Tratamiento: Ratones machos de edad fértil se seleccionaron al azar y se colocaron en jaulas individuales para los bioensayos. Se establecieron tres grupos experimentales de 8 ratones cada uno que bebieron ad libitum durante 8, 16 y 35 días un extracto acuoso de mashua a la concentración de 50 mg / ml. El grupo de control bebió agua del grifo.

Se reemplazó un nuevo suministro de extracto cada 24 h, y se registraron los volúmenes ingeridos todos los días.

Las hembras nulíparas fueron enjauladas individualmente con los ratones machos durante la noche. A la mañana siguiente las hembras con presencia de tapón vaginal, fueron consideradas hembras postcoito, en día 1 de embarazo. Sólo quedaron preñadas 7 ratonas del grupo control y 7 del día de tratamiento 35, de los días 8 y 16 de tratamiento quedaron cruzadas 8 ratonas en cada día.

3. Diferenciación temprana y escala de embriones preimplantacionales de ratón Después del tratamiento, los ratones machos fueron enjaulados con ratones hembra nulíparas. Se observó la presencia de tapón vaginal en las hembras para determinar si se produjo la cópula. Las hembras preñadas se mantuvieron hasta 4 días. En el día 4 de preñez, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, se aislaron los oviductos y cuernos uterinos en una placa embriológica y se perfusionaron con solución de Fosfato Buffer Salino (PBS) (pH 7), obteniendo los embriones para su posterior evaluación.

Se establecieron tres categorías de gradación para clasificar a los embriones: 1) Grado I: excelente o bueno; 2) Grado II: regular; 3) Grado III: pobre; 4) Degenerado⁽¹⁰⁾. El sistema de gradación es el siguiente: 1) Grado I: embriones con una masa simétrica, blastómeros uniformes en tamaño, color

y densidad por lo menos con un 85% del material celular intacto, masa embrionaria viable; 2) Grado II: embriones con una moderada irregularidad en su forma, tamaño, color y densidad de células individuales, por lo menos en un 50% del embrión íntegro; 3) Grado III: embriones con una mayor irregularidad en forma, tamaño, color y densidad de células individuales por lo menos en un 25% del embrión íntegro; 4) Degenerado: embriones u ovocitos muertos o severamente deteriorados, oocitos o embriones de una célula no viables⁽¹¹⁾.

Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico SPSS V25.0. Las diferencias en el peso se analizaron mediante ANOVA. Las etapas de desarrollo y los grados de calidad embrionaria se analizaron mediante la prueba de chi-cuadrado.

Aspectos éticos

El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo con las pautas éticas de nuestra institución.

RESULTADOS

Hubo una diferencia en el peso materno entre un grupo (Trat35D) y los otros tratamientos grupales experimentales en el día 1 de preñez. Este evento desapareció en el día 4 de preñez sin mostrar ninguna diferencia estadística entre los grupos experimentales. No hubo diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento en relación con el número de embriones y cuerpos lúteos. (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros reproductivos de ratones hembras apareadas con ratones machos tratados con solución acuosa de *Tropaeolum tuberosum*.

| Tratamiento ratones machos | Grupo control | T-8d | Grupo casos T-16d | T-35d |
|----------------------------|---------------|--------------|-------------------|---------------|
| Hembras preñadas | 7 | 8 | 8 | 7 |
| Peso de hembras día 1 | 26,50 ± 0,56 | 25,11 ± 0,47 | 24,94 ± 1,00 | 21,94 ± 0,69* |
| Peso de hembras día 4 | 25,96 ± 1,02 | 26,05 ± 0,44 | 27,53 ± 1,09 | 24,23 ± 0,82 |
| Embriones | 9,86 ± 1,22 | 9,00 ± 0,65 | 8,37 ± 1,49 | 10,00 ± 0,72 |
| Cuerpo lúteo | 11,29 ± 1,06 | 9,63 ± 0,53 | 10,63 ± 0,89 | 10,57 ± 0,53 |

* La diferencia estadística son significativas, 0,05 del ANOVA. Los valores se expresan como medias ± S.E. (desviación estándar).

Grupo control; Grupo casos (experimentales): T-8d: ratones machos tratados con solución acuosa de *T. tuberosum* durante 8 días; T-16d: ratones machos tratados con solución acuosa de *T. tuberosum* durante 16 días; T-35d: ratones machos tratados con solución acuosa de *T. tuberosum* durante 35 días.



La evaluación de la diferenciación temprana en embriones preimplantacionales de ratón mostró que el grupo de control produjo 78,57% de blastocistos, 20% de mórula compactada y 1,43% de embriones en otras etapas de desarrollo tardío. Los ratones machos del grupo casos de 8 días de ingesta de extracto acuoso ad libitum, en una concentración de 50 g/Kg de peso corporal produjeron 80,56% de blastocistos, 4,17% de mórula compactada y 15,28% de embriones

en otras etapas tardías de desarrollo. Los casos de 16 días produjeron el 71,79% de los blastocistos, el 2,56% de la mórula compactada y el 23,08% de los embriones en otras etapas tardías de desarrollo. Finalmente, los casos de 35 días produjeron el 80% de los blastocistos, el 1,43% de la mórula compactada y el 18,57% de los embriones en otras etapas tardías de desarrollo (Tabla 2).

Tabla 2. Etapas del desarrollo embrionario relacionado con los grupos tratamiento y control en ratones tratados con solución acuosa de *Tropaeolum tuberosum*.

| Tratamiento ratones machos | Grupo control | T-8d* | Grupo casos T-16d** | T-35d** |
|----------------------------|---------------|--------------|---------------------|--------------|
| Hembras preñadas | 7 | 8 | 8 | 7 |
| Estadio embrionario | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| Blastocisto | 55 (78,57) | 58 (80,56) | 56 (71,79) | 56 (80,00) |
| Mórula | 14 (20,00) | 5 (6,94) | 2 (2,56) | 1 (1,43) |
| De 1 a 8 células | 1 (1,43) | 3 (4,17) | 2 (2,56) | 0 (0,009) |
| Indeterminado | 0 (0,00) | 6 (8,33) | 18 (23,08) | 13 (18,57) |

n: número de embriones, (%): porcentaje de embriones. Diferencias estadísticamente significativas: * p = 0,0026; ** p < 0,0001 (chi-square). Grupo control; Grupo casos (experimentales): T-8d: ratones machos tratados con solución acuosa de *T. tuberosum* durante 8 días; T-16d: ratones machos tratados con solución acuosa de *T. tuberosum* durante 16 días; T-35d: ratones machos tratados con solución acuosa de *T. tuberosum* durante 35 días.

Estos resultados indican un incremento progresivo en el número de embriones retrasados que no pasaron la etapa de mórula compactada en relación con los progenitores de ratones machos tratados con extracto acuoso de mashua. Las diferencias entre el control y los grupos experimentales fueron estadísticamente significativas.

La evaluación de la calidad del embrión mostró en el grupo de control que el 97,14% correspondió al Grado I-Grado II (embriones con la mejor puntuación: mejor aspecto, blatómeros de igual tamaño y con poca o ninguna fragmentación de citoplasma), mientras que el 0% correspondió al Grado III, y 2,86% a embriones degenerados (embriones con la peor puntuación: aspecto irregular, blastómeros de tamaño desigual y con fragmentación de citoplasma).

Los progenitores de ratones machos que bebieron el extracto acuoso de mashua durante 8 días produjeron

79,17% de embriones correspondientes a Grado I-Grado II, mientras que 8,33% eran de Grado III y 12,5% eran embriones degenerados. Los progenitores de ratones machos que bebieron el extracto acuoso de mashua durante 16 días produjeron el 73,07% de embriones correspondientes al Grado I-Grado II, mientras que el 2,56% eran de Grado III y el 24,37% eran embriones degenerados. Los progenitores de ratones machos que bebieron el extracto acuoso de mashua durante 35 días produjeron 67,14% de embriones correspondientes a Grado I-Grado II, mientras que 14,29% eran de Grado III y 18,57% eran embriones degenerados (Tabla 3). Estos resultados indican una disminución progresiva en la calidad del embrión en relación con los progenitores de ratones machos tratados con extracto acuoso de mashua. Las diferencias entre el control y los grupos experimentales fueron estadísticamente significativas.

ARTÍCULO ORIGINAL

Tabla 3. Clasificación de embriones relacionados con los grupos tratamiento y control en ratones tratados con solución acuosa de *Tropaeolum tuberosum*.

| Tratamiento ratones machos | Grupo control | T-8d* | Grupo casos T-16d** | T-35d** |
|----------------------------|---------------|------------|---------------------|------------|
| Hembras preñadas | 7 | 8 | 8 | 7 |
| Grado embrionario | n (%) | n (%) | n (%) | n (%) |
| I | 42 (60) | 0 (0,00) | 17 (21,79) | 8 (11,43) |
| II | 26 (37,14) | 57 (79,17) | 40 (51,28) | 39 (55,71) |
| III | 0 (0,00) | 6 (8,33) | 2 (2,56) | 10 (14,29) |
| Degenerados | 2 (2,86) | 9 (12,5) | 19 (24,37) | 13 (18,57) |

n: número de embriones, (%): porcentaje de embriones. Diferencias estadísticamente significativas: * $p < 0.0001$ (chi-square).

Grupo control; Grupo casos (experimentales): T-8d: ratones machos tratados con solución acuosa de *T. tuberosum* durante 8 días; T-16d: ratones machos tratados con solución acuosa de *T. tuberosum* durante 16 días; T-35d: ratones machos tratados con solución acuosa de *T. tuberosum* durante 35 días.

Estos resultados indican un incremento progresivo en el número de embriones retrasados que no pasaron la etapa de mórula compactada en relación con los progenitores de ratones machos tratados con extracto acuoso de mashua. Las diferencias entre el control y los grupos experimentales fueron estadísticamente significativas.

La evaluación de la calidad del embrión mostró en el grupo de control que el 97,14% correspondió al Grado I-Grado II (embriones con la mejor puntuación: mejor aspecto, blastómeros de igual tamaño y con poca o ninguna fragmentación de citoplasma), mientras que el 0% correspondió al Grado III, y 2,86% a embriones degenerados (embriones con la peor puntuación: aspecto irregular, blastómeros de tamaño desigual y con fragmentación de citoplasma).

DISCUSIÓN

Tres mecanismos pueden explicar por qué la calidad de los espermatozoides afecta a la embriogénesis: 1) actividad transcripcional débil en el pronúcleo masculino, 2) señalización anormal de calcio que produce fallas de activación en los ovocitos y alteraciones del desarrollo pronuclear y, 3) anomalías en el aster derivado de los espermatozoides que resultan en ambas aposición inadecuada del pronúcleo⁽¹²⁻¹⁴⁾ y fallas en la mitosis⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

En una investigación previa, realizada en nuestro laboratorio se observó que el extracto acuoso de Mashua afectaba la morfología de la cabeza y el flagelo en los espermatozoides obtenidos del epidídimo en ratones. Por lo general, las alteraciones de la morfología dan testimonio de material genético anormal del espermatozoide⁽¹⁸⁾. Estos resultados son similares a otros estudios que sugieren un posible efecto del extracto de mashua en espermatozoides secundarios y espermátidas redondas durante la espermatogénesis de ratones^(6,7). La espermatogénesis es el proceso por el cual las células germinales inmaduras sufren división, meiosis y diferenciación para dar lugar a espermátidas alargadas haploides⁽¹⁹⁾. Cuando se completa el desarrollo de las células germinales, las espermátidas maduras ingresan al epidídimo, donde adquieren movilidad y capacidad de fertilización del óvulo. En la regulación endocrina y paracrina de la espermatogénesis, la producción de testosterona por las células de Leydig es esencial por sus efectos biológicos en los testículos y la espermatogénesis en su conjunto^(20,21). En la espermiogénesis ocurre la formación del acromosoma y el flagelo, la reordenación nuclear, la condensación de cromatina, el empaquetamiento del ADN, la acumulación de ARNm en el núcleo y la eliminación del citoplasma de los espermatozoides⁽²²⁻²⁴⁾. El tratamiento con mashua afecta la morfología de los espermatozoides y produce



espermatozoides con una capacidad alterada para producir embriones preimplantacionales normales, y este hecho estaría relacionado con algún tipo de alteración genética en los espermatozoides.

Se sabe que la calidad del esperma depende de la condensación de cromatina y la integridad nuclear de los gametos^(24,25). Por otro lado, se requieren gametos de alta calidad para producir embriones de alta calidad, y que ambos genomas de gametos contribuyen al genoma embrionario^(26,27). Los estudios experimentales han demostrado que el desarrollo de embriones de mamíferos depende en parte de la integridad del ADN de los espermatozoides y la calidad genética en las células de los espermatozoides puede causar la detención en el desarrollo embrionario temprano⁽²⁷⁻²⁹⁾. Si la integridad del ADN se ve afectada, se produce un desarrollo embrionario lento, se produce un potencial disminuido para alcanzar la etapa de blastocisto produciendo embriones con morfología alterada y características de bajo puntaje⁽³⁰⁻³²⁾. El embrión de baja calidad está estrechamente relacionado con la calidad del ADN de los espermatozoides y esta relación puede evaluarse en el embrión teniendo en cuenta el número celular, la morfología, el tamaño y la fragmentación de blastómeros^(11,33,34). En la fragmentación de embriones, la pérdida de porciones de citoplasma está relacionada con la citocinesis o apoptosis imperfecta⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ y estos eventos producen distorsión de los planos de división celular o interferencias con el contacto normal de células a células, lo que conduce a una compactación, cavitación y cavitación anormales. Formación de blastocistos⁽³⁵⁾. En humanos, el ARNm heredado por vía materna controla las divisiones iniciales del cigoto; y el genoma embrionario está inactivo hasta la etapa de 4 células, después de la cual comienza la expresión de genes derivados de esperma, de modo que la influencia paterna en el desarrollo embrionario debería ser obvia hasta el día 8 -célula etapa^(27,36,37).

La reducción significativa en el número de embriones en la etapa de mórulas y un aumento no significativo en los embriones en la etapa indeterminada, así como una reducción en la calidad de los embriones podrían estar relacionados tanto con la integridad del ADN afectado en el esperma como con la alteración de la activación del genoma en los embriones tempranos (4 a 8 células), y la alteración del complejo centrosomal de la célula de esperma que podría afectar la mitosis en el embrión^(14,27), lo que llevaría a un retraso en el desarrollo del embrión.

El daño del ADN espermático puede ocurrir por

condensación defectuosa de cromatina, alteración de la integridad del ADN o por estrés oxidativo resultante de especies reactivas de oxígeno (ROS)^(19,38,39). Es probable que los espermatozoides de ratones expuestos a sustancias bioactivas del extracto acuoso de mashua sufran alguna alteración durante la espermatogénesis, lo que causaría una disminución de su calidad genética que afecta tanto la expresión génica en el aparato pronúcleo masculino como el mitótico. Los isotiocianatos de mashua (ITC) son compuestos bioactivos derivados de glucosinolatos⁽⁴⁰⁻⁴²⁾. Se ha sugerido que la acción de ITC está relacionada con la inducción de daño en el ADN, la inhibición de la síntesis de ADN, la alteración del empaque de cromatina por acetilación de histonas, la activación de la apoptosis, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), el estrés oxidativo, y la represión genética del receptor de andrógenos (AR)⁽⁴³⁻⁴⁵⁾. Los elementos de radicales libres como ROS pueden afectar la calidad del ADN espermático^(38,39). El ITC induce la producción de ROS, y el estrés oxidativo está asociado con el daño del ADN. Independientemente del origen de ROS, su presencia puede causar fragmentación del ADN espermático, afectando tanto la integridad genómica como el desarrollo embrionario después de la fecundación^(38,39,19). El ITC puede unirse covalentemente a proteínas, inactivando actividades enzimáticas⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾. Por otro lado, el p-metoxibencil-glucosinolato presente en mashua muestra propiedades antiproliferativas y proapoptóticas respectivamente^(8,9). Tanto las acciones de ITC como de p-metoxibencil-glucosinolato afectarían la espermatogénesis de los ratones, la producción de espermatozoides, la calidad de los espermatozoides y el desarrollo embrionario que altera la activación del genoma masculino, el complejo centrosomal y la mitosis.

En nuestros resultados hay un grupo de embriones obtenidos de espermatozoides expuestos a mashua para alcanzar la etapa de blastocisto que exhiben una calidad embrionaria aceptable. En ratas, el tratamiento con isotiocianato de bencilo, un componente principal en *Tropaeolum tuberosum*, mostró un aumento no significativo dependiente de la dosis en las resorpciones fetales tempranas antes de la implantación, no hubo diferencias significativas en el número de sitios de implantación, y no hubo diferencias significativas en el número de resorpciones fetales, lo que permitió concluir que la acción de esta molécula no cambió los resultados del embarazo durante los períodos pre y postimplantación en

ratas⁽⁴⁹⁾. Estos hechos podrían indicar que la capacidad de desarrollo de los embriones de ratones no se vería afectada de manera permanente e irreversible por el tratamiento con mashua, y la capacidad de los embriones para completar su desarrollo durante el período de embarazo no se vería afectada.

Los espermatozoides de baja calidad producen embriones de baja calidad. Esto es evidente en relación con los espermatozoides expuestos a mashua por el incremento en el número de embriones retrasados que no pasaron la etapa de mórula compactada después de la fertilización. Sin embargo, este efecto no sería permanente y es posible la capacidad de los embriones para completar su desarrollo hasta el final del embarazo.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con mashua produce una reducción significativa en el número de embriones en la etapa de mórulas y un aumento no significativo en los embriones en la etapa indeterminada, así como una reducción en la calidad y la capacidad de los embriones para desarrollarse normalmente hasta alcanzar la etapa de blastocisto.

La limitación de nuestro trabajo de investigación definitivamente es la muestra ya que es un trabajo preliminar, una muestra más grande asegura una distribución representativa de la población y ser considerados representativos de los grupos de personas, objetos, procesos, etc., estudiados. Aunque, por supuesto, el tamaño de la muestra es menos relevante en la investigación cualitativa.

Correspondencia: José Luis Rafael Pino Gavino.

Dirección: Av. German Amézaga 375, cercado Lima-Perú.

Teléfono: 992169186.

Correo: jpinog@unmsm.edu.pe

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chirinos R, Campos D, Warnier M, Pedreschi R, Rees JF, Larondelle Y. Antioxidant properties of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) phenolic extracts against oxidative damage using biological in vitro assays. *Food Chemistry* 111 (2008) 98–105.
- Chirinos R., D. Campos, N. Costa, et al. Phenolic profiles of andean mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers: Identification by HPLC - DAD and evaluation of their antioxidant activity. *Food Chemistry* (2008) 106:1285-1298.
- Chirinos R, Hervé R, Campos D, Pedreschi R, Larondelle Y. Phenolic compound contents and antioxidant activity in plants with nutritional and/or medicinal properties from the Peruvian Andean region. *Industrial Crops and Products* 47 (2013) 145–152
- Jhons T, Kitts WD; Newsome F; Neil Towers GH. Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum*. *J Ethnopharmacol* 1982; 5(2): 146-61.
- Cárdenas-Valencia, J. Nieto, M. Gasco, C. Gonzales, J. Rubio, J. Portella & G. F. Gonzales. *Tropaeolum tuberosum* (Mashua) reduces testicular function: effect of different treatment times. *Andrologia* 2008; 40: 352–357.
- Leiva-Revilla, J; Cárdenas-Valencia, I; Rubio, J; Guerra-Castanõn, F; Olcese-Mori, P; Gasco M; Gonzales, G. Evaluation of different doses of mashua (*Tropaeolum tuberosum*) on the reduction of sperm production, motility and morphology in adult male rats. *Andrologia* 2012 44 (1): 205-212
- Vásquez, J., Gonzales, J. & Pino J. Decrease in spermiatic parameters of mice treated with hydroalcoholic extract *Tropaeolum tuberosum* "mashua". *Revista Peruana de Biología* 2012; 19(1):89-93.
- Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, Fernandez G, Yucra S, Rubio J, Yi P, Gasco M. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Endocrinol Biol Reprod.* 2005; 3:5.
- Rubio J, Riqueros MI, Gasco M, Yucra S, Miranda S, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol* 2006; 44:1114–1122.
- Rocha JC, Passalia F, Matos FD, et al. Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA Assist Reprod.* 2016; 20, 150-8.
- Bó GA & Mapletoft RJ. Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.* 2013;10: 344-348.

CONCLUSIÓN

El tratamiento con mashua produce una reducción significativa en el número de embriones en la etapa de mórulas y un aumento no significativo en los embriones en la etapa indeterminada, así como una reducción en la calidad y la capacidad de los embriones para desarrollarse normalmente hasta alcanzar la etapa de blastocisto.

Los espermatozoides de baja calidad producen embriones de baja calidad. La calidad espermática de los ratones expuestos a la acción de la mashua disminuye; debido a esto se incrementa el número de embriones retrasados que no pasaron la etapa de mórula compactada después de la fertilización. Es posible, que este efecto no sea permanente y que los embriones mantengan la capacidad de completar su desarrollo hasta el final de la preñez.

Contribuciones de autoría: Los autores participaron en la génesis de la idea, diseño del proyecto, desarrollo, recolección e interpretación de data, análisis de resultados y preparación de manuscrito.

Financiamiento: Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional de San Marcos (Proyecto de investigación RR. N° 00251-R-11).

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés en la publicación de este artículo.

Recibido: 28 de junio 2020

Aprobado: 07 de agosto 2020



12. Ao A, Erickson RP, Winston RM, Handyside AH. Transcription of paternal Y-linked genes in the human zygote as early as the pronucleate stage. *Zygote*. 1994; 2:281-7.
13. Tesarik J, Sousa M, Testart J. Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1994; 9:511-8.
14. Setti AS, Braga DP, Vingris L, Serzedello T, Figueira R de C, Iaconelli A Jr, Borges E Jr. Sperm morphological abnormalities visualized at high magnification predict embryonic development, from fertilization to the blastocyst stage, in couples undergoing ICSI. *J Assist Reprod Genet*. 2014 Nov; 31(11):1533-9. doi:10.1007/s10815-014-0326-9.
15. Jurisicova A, Varmuza S, Casper RF. Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol Hum Reprod* 1996; 2:93-8.
16. Antcak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum Reprod* 1999; 14:429-47.
17. Ebner T, Yaman C, Moser M, Sommergruber M, Polz W, Tews G. Embryo fragmentation in vitro and its impact on treatment and pregnancy outcome. *Fertil Steril*. 2001 Aug; 76(2):281-5.
18. Marzec-Wróblewska U, Kamiński P, Lakota P. Influence of chemical elements on mammalian spermatozoa. *Folia Biol (Praha)*. 2012; 58(1):7-15. Review.
19. Ioannou D, Miller D, Griffin DK, Tempest HG. Impact of sperm DNA chromatin in the clinic. *J Assist Reprod Genet*. 2016 Feb; 33(2):157-66. doi:10.1007/s10815-015-0624-x. Review.
20. Weinbauer GF, Wessels J. 'Paracrine' control of spermatogenesis. *Andrologia*. 1999; 31(5):249-62.
21. Johnson MH, Everitt BJ. Essential reproduction. London: Blackwell Science Ltd., 2000
22. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001; 22(3):289-318
23. Dadoune JP, Siffroi JP, Alfonsi MF. Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol*. 2004; 237:1-56.
24. González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci*. 2012 Oct 31;13(11):14026-52. doi: 10.3390/ijms131114026. Review.
25. Tomlinson MJ, Moffatt O, Manicardi GC, Bizzaro D, Afnan M, Sakkas D. Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum Reprod*. 2001; 16(10):2160-5.
26. Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod Biol* 2009; 9:203-224.
27. Simon L, Murphy K, Shamsi MB, Liu L, Emery B, Aston KI, Hotaling J, Carrell DT. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod*. 2014 Nov;29(11):2402-12. doi: 10.1093/humrep/deu228.
28. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; 461:1071-1078.
29. Zini A, Jamal W, Cowan L, Al-Hathal N. Is sperm DNA damage associated with IVF embryo quality? A systematic review. *J Assist Reprod Genet*. 2011 May;28(5):391-7. doi: 10.1007/s10815-011-9544-6. Review.
30. Nasr-Esfahani MH, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. *Reprod Biomed Online*. 2005; 11(2):198-205.
31. Muriel L, Garrido N, Fernandez JL, Remohi J, Pellicer A, de los Santos MJ, Meseguer M. Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 2006; 85(2):371-83.
32. Tavares RS, Silva AF, Lourenço B, Almeida-Santos T, Sousa AP, Ramalho-Santos J. Evaluation of human sperm chromatin status after selection using a modified Diff-Quik stain indicates embryo quality and pregnancy outcomes following in vitro fertilization. *Andrology*. 2013 Nov;1(6):830-7. doi:10.1111/j.2047-2927.2013.00127.x.
33. Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod*. 1987; 2(8):705-8.
34. Desai NN, Goldstein J, Rowland DY, Goldfarb JM. Morphological evaluation of human embryos and derivation of an embryo quality scoring system specific for day 3 embryos: a preliminary study. *Hum Reprod*. 2000; 15(10):2190-6.
35. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi J, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation and its implication for pregnancy and implantation. *Fertility and Sterility* 1999 71(5): 836-842.
36. Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 1990;26:90-100.
37. Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988;332:459-61.
38. Simões R, Feitosa WB, Siqueira AF, Nichi M, Paula-Lopes FF, Marques MG, Peres MA, Barnabe VH, Visintin JA, Assumpção ME. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction*. 2013 Oct 1;146(5):433-41. doi: 10.1530/REP-13-0123.
39. Kato Y, Nagao Y. Changes in Sperm Motility and Capacitation Induce Chromosomal Aberration of the Bovine Embryo following Intracytoplasmic Sperm Injection. *PLoS One*. 2015 Jun 10;10(6):e0129285. doi: 10.1371/journal.pone.0129285. PubMed PMID:26061876; PubMed Central PMCID: PMC4465702.
40. Fahey JW, Zalcmann AT, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 2001; 56:5-51.
41. Ramallo R., J.P. Wathelet, É. Le Boulengé, et al. 2004. Glucosinolates in isano (*Tropaeolum tuberosum*) tubers: qualitative and quantitative content and changes after maturity. *J. of Sci. Food. Agri*. 84:701-706
42. Lynn A, Collins A, Fuller Z, Hillman K, Ratcliffe B. Cruciferous vegetables and colo-rectal cancer. *Proc Nutr Soc*. 2006; 65(1):135-44.
43. Beklemisheva AA, Fang Y, Feng J, Ma X, Dai W, Chiao JW. Epigenetic mechanism of growth inhibition induced by phenylhexyl isothiocyanate in prostate cancer cells. *Anticancer Res*. 2006; 26(2A):1225-30.
44. Ma X, Fang Y, Beklemisheva A, Dai W, Feng J, Ahmed T, Liu D, Chiao JW. Phenylhexyl isothiocyanate inhibits histone deacetylases and remodels chromatin to induce growth arrest in human leukemia cells. *Int J Oncol*. 2006; 28(5):1287-93.
45. Wang LG, Liu XM, Chiao JW. Repression of androgen receptor in prostate cancer cells by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis*. 2006 Oct;27(10):2124-32. doi: 10.1093/carcin/bgl075.
46. Zhang Y., L. Tang, V. Gonzalez. 2003. Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. *Mol. Cancer Ther*. 2:1045-1052.
47. Nakamura Y, Miyoshi N. Cell death induction by isothiocyanates and their underlying molecular mechanisms. *Biofactors*. 2006; 26(2):123-34.
48. Zhang R., S. Loganathan, I. Humphreys, et al. 2006. Benzyl isothiocyanate-induced DNA damage causes G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer. 2006 Nov;136(11):2728-34. doi: 10.1093/jn/136.11.2728.
49. Adebisi A, Adaikan PG, Prasad RN. Pregnancy outcomes following pre- and post-implantation exposure of Sprague-Dawley rats to benzyl isothiocyanate. *Food Chem Toxicol*. 2004 May;42(5):715-20. PubMed PMID: 15046816.