



# MAYTENUS MACROCARPA "CHUCHUHUASI" DISMINUYE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LA FERTILIDAD EN RATONES

## MAYTENUS MACROCARPA "CHUCHUHUASI" DECREASE THE FERTILITY AND SPERM QUALITY IN MICE

Jonathan Vásquez Cavello<sup>1,2</sup>, Pilar Pino Velásquez<sup>1,a,b</sup>, José Gonzáles Daga<sup>1,a,c</sup>, Eduardo Pulido Murillo<sup>3,d</sup>, José Pino Gaviño<sup>1,a</sup>

### RESUMEN

**Introducción:** Maytenus macrocarpa (MM) "Chuchuhuasi", es una planta nativa de la región Amazónica de Sudamérica ampliamente usada en la medicina tradicional por sus propiedades antiinflamatoria, analgésica y antitumoral. Sin embargo, sus efectos sobre la fisiología reproductiva y la fertilidad masculina aún no han sido elucidados. **Métodos:** Estudio experimental preclínico de caso y controles. A ratones machos de ocho semanas se les administró oralmente por 70 días (dos ciclos espermatogénicos) el extracto acuoso de MM: grupo control GC (n=8) 0 mg/kg peso corporal (pc) y al grupo tratado GT (n=8) 1000 mg/kg pc. Posteriormente los animales fueron eutanizados, se registraron el peso de los órganos reproductivos, la movilidad y concentración espermática. Durante los días 60 a 65 del tratamiento los machos se aparearon y las hembras preñadas se sacrificaron al cuarto de día de preñez para la evaluación del desarrollo, calidad y grado de blastulación de los embriones. **Resultados:** Los pesos de los órganos reproductivos no variaron significativamente entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, la movilidad progresiva ( $32,81 \pm 4,17\%$  vs.  $15,27\% \pm 2,08$ ) y concentración espermática ( $7,75 \pm 0,34 \times 106/ml$  vs.  $2,56 \pm 0,42 \times 106/ml$ ) disminuyeron significativamente entre GC y GT, respectivamente. El 87,5% (7/8) de ratones del GC preñaron produciendo 15 camadas y del GT sólo el 50% (4/8) preñaron produciendo 4 camadas. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de embriones en estadio de blastocisto, embriones de buena calidad, ni en embriones con blastocelo mayor al 50% del tamaño del embrión entre ambos grupos ( $p > 0.05$ ). **Conclusión:** el extracto acuoso de Maytenus macrocarpa (1000 mg/kg) podría poseer acciones anti-reproductiva en ratones machos.

**Palabras clave:** Calidad espermática, Embriones, Extracto acuoso, Fertilidad, Maytenus macrocarpa. (Fuente: DeCS- BIREME)

### ABSTRACT

**Introduction:** Maytenus macrocarpa (MM) "Chuchuhuasi" is a native plant from the Amazon region of South America, widely used in traditional medicine due its anti-inflammatory, analgesic and anti-tumor properties. However, its effects on reproductive physiology and male fertility have not been elucidated. **Methods:** Preclinical experimental study of cases and controls. Male mice with eight weeks from birth were administered orally for 70 days (two spermatogenic cycles) an aqueous extract MM: GC (n = 8) 0 mg / kg body weight (bw) control group and treated group GT (n = 8) 1000 mg / kg bw. Later the animals were euthanized, the reproductive organs were weighted, also motility and sperm count were recorded. During the days 60 or 65 of treatment, males were mated and pregnant females were sacrificed in the fourth day of pregnancy for evaluating development, quality and degree of blastulation. **Results:** The weights of reproductive organs did not differ significantly between the two groups ( $p > 0.05$ ). However, progressive motility ( $32.81$  vs.  $15.27 \pm 4.17\% \pm 2.08\%$ ) and sperm count ( $7.75 \pm 0.34 \times 106 / ml$  vs.  $2.56 \pm 0.42 \times 106 / ml$ ) decreased significantly between GC and GT, respectively. 87.5% (7/8) of the pregnant mice produced 15 litters (GC) and only 50% (4/8) of the pregnant GT yields 4 litters. However, no significant differences were found in the percentage of blastocyst stage embryos, good quality embryos, or embryos with greater than 50% the size of the embryo between the two groups ( $p > 0.05$ ) blastocetes. **Conclusion:** the aqueous extract of Maytenus macrocarpa (1000 mg/kg) could have possesses anti-reproductive action in male mice.

**Keywords:** Spermatic parameters, Embryos classification, Aqueous extract, Fertility, Maytenus macrocarpa. (Source: MESH-NLM)

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

<sup>2</sup> Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.

<sup>3</sup> Instituto de investigaciones en ciencias biomédicas. Facultad de medicina humana. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú.

<sup>a</sup> Biólogo

<sup>b</sup> Magister en Procedimientos en Reproducción Asistida.

<sup>c</sup> Magister en Biología Molecular.

<sup>d</sup> Patólogo clínico

Citar como: Vásquez Cavello J, Pino Velásquez P, Gonzáles Daga J, Pulido-Murillo E, Pino Gaviño J. Maytenus macrocarpa "chuchuhuasi" disminuye la calidad espermática y la fertilidad en ratones. Rev Fac Med Hum. 2022;22(4):725-734. doi 10.25176/RFMH.v22i4.5115

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](mailto:revista.medicina@urp.pe)



## INTRODUCCIÓN

Las plantas y sus compuestos activos han sido utilizados como una fuente importante de medicinas para el tratamiento de distintas enfermedades. El potencial terapéutico de la mayoría de estas plantas se basa en sus propiedades anti-cancerígena, anti-diabética, hepatoprotectiva, cardioprotectiva, analgésica y otras propiedades farmacológicas<sup>(1)</sup>. Sin embargo, algunas plantas pueden afectar negativamente distintas funciones fisiológicas, entre ellas la función reproductiva masculina, cuyos efectos adversos han sido atribuidos principalmente a propiedades anti-espermatogénicas y anti-esteroidogénicas de uno o más compuestos activos<sup>(2-5)</sup>. Debemos considerar la importancia del estudio de las plantas medicinales debido a que aproximadamente el 75-80% de la población mundial las consume<sup>(6)</sup> y en el Perú 1400 especies de plantas son utilizadas con fines medicinales, cuyo uso popular se registra desde hace miles de años<sup>(7)</sup>.

Celastraceae es una gran familia de árboles y arbustos, existen aproximadamente 89 géneros y 1300 especies que se han utilizado por siglos para el tratamiento de complicaciones estomacales, fiebre, reumatismo y cáncer<sup>(8)</sup>. La familia Celastraceae es reconocida en el Perú por presentar ocho géneros y 29 especies<sup>(9)</sup> y siendo *Maytenus* uno de los más grandes géneros<sup>(10)</sup> y sus plantas son usadas en la medicina tradicional de Sudamérica como infusiones<sup>(11)</sup>. Los metabolitos del género *Maytenus* son principalmente triperenos<sup>(12,13)</sup> y flavonoides<sup>(14)</sup>. Se ha demostrado la actividad biológica de varias especies de *Maytenus*: *M. ilicifolia* como anticonceptivo, antiinflamatorio y antioxidante<sup>(15,16)</sup>; *M. krukovii* presenta actividad antioxidante, antimutagénica y antimicrobiana<sup>(17)</sup>; *M. aquifolium*, propiedades analgésicas<sup>(18)</sup>; *M. senegalensis* posee actividad antibacteriana, antiviral, antitumoral<sup>(19,20,21)</sup> y *M. macrocarpa* actúa como agente citotóxico<sup>(22)</sup> y antimicrobiano<sup>(23)</sup>.

*Maytenus macrocarpa* Ruiz y Pav. (Chuchuhuasi) es una planta nativa de la región Amazónica del Perú, su corteza es utilizada generalmente como aguardiente para el tratamiento de reumatismo, influenza, enfermedades gastrointestinales y como agente antitumoral<sup>(24)</sup>. Existe escasa información de los efectos de las plantas del género *Maytenus* sobre el sistema reproductor en mamíferos; Montanari et al.,<sup>(25)</sup> proporcionaron dosis diarias de 800 mg/kg pc del extracto etanólico de *M. ilicifolia* a ratones y el análisis

microscópico de los túbulos seminíferos no mostró anomalías. Sin embargo, en dosis diarias de 1000 mg/kg pc el extracto hidroalcohólico de *M. ilicifolia* interfirió negativamente con la implantación embrionaria en ratones.

El presente estudio tiene como objetivo evaluar las implicancias de la ingesta del extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa* (1000 mg/kg pc) durante 2 ciclos espermatogénicos (70 días) sobre parámetros reproductivos y la fertilidad en ratones.

## 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 20 ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa BALB/c de 8-10 semanas de edad, el grupo casos (experimental) lo conformó 10 ratones, a quienes se les administró extracto acuoso mediante sonda nasogástrica N°18 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA), en una concentración de 1000 mg/kg de peso corporal durante 70 días. El grupo control lo integro 10 ratones quienes recibieron por la misma vía agua destilada. Todos se mantuvieron en una habitación con temperatura controlada (22-25°C) con ciclos de luz y oscuridad de 14/10 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: *Maytenus macrocarpa* se adquirió de la empresa PromoAgro export SAC (Lima, Perú). El extracto acuoso se preparó a partir del material seco y en polvo de la corteza. Se calentó 100 g de Chuchuhuasi (90-100 °C) durante 30 minutos en 1 L de agua. Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente toda la noche y al día siguiente el

sobrenadante se filtró dos veces con papel filtro estéril Whatman (40µm y 20 µm) hasta obtener una pasta. La pasta se disolvió en agua destilada. El volumen final del extracto (100 mg-ml) se alicuotó en viales de 1.5 ml y almacenó a 4° C hasta su uso.

2.Tratamiento: Ratones fueron divididos en dos grupos; al Grupo Tratamiento (GT) (n=10) se le administró el extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa* (1000 mg/kg pc) y al Grupo Control (GC) (n=10) agua destilada (vehículo) por 70 días. El extracto acuoso de *M. macrocarpa* y el agua destilada fueron administrados usando una sonda esofágica N°18 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Cada 7 días se registró el peso corporal y transcurrido el tratamiento los animales fueron eutanizados por dislocación cervical. Se registró el peso de los órganos reproductivos: testículos, epidídimos y próstata mediante una balanza analítica con 0.001 gr de sensibilidad. Se obtuvieron espermatozoides de la cola del epidídimo y se analizó la movilidad y concentración espermática según WHO (2010).

3. Obtención de epidídimos y espermatozoides: Cada uno de los epidídimos obtenidos fueron lavados con buffer fosfato salino (PBS pH 7,4) a 37°C, se realizaron varios cortes en la cola del epidídimo y luego los espermatozoides se liberaron permaneciendo durante 10 minutos en 0.5 ml de medio de cultivo Flushing (MediCult®, Copenhagen, Dinamarca), el contenido espermático se recuperó en su totalidad en tubos de polipropileno de 1,5 ml (Axygen Scientific).

4. Evaluación de la movilidad espermática: Una gota de muestra espermática (10 ul) fue colocada sobre una lámina portaobjetos atemperada a 37°C en incubadora con CO<sub>2</sub> y directamente observada a 400 X en un microscopio de contraste de fases (AJ Seitz, San Francisco, U.S.A). Este procedimiento fue realizado dos veces, los resultados presentados son el promedio de ambas evaluaciones, siendo evaluados al menos 200 espermatozoides. Se consideró que un espermatozoide presentaba Movilidad Progresiva (MP), cuando se desplazaba, Movilidad no Progresiva (MNP) a aquellos que no se desplazaban y solo tenían un movimiento in situ e Inmóviles (I), los que no presentaban ningún tipo de movimiento<sup>(6)</sup>.

Medición de la concentración espermática: La concentración espermática se calculó usando una dilución 1:20, 10 µl de la muestra se diluyó con 190 µl de

bicarbonato de sodio<sup>(6)</sup>. Seguidamente se cargó la cámara de Neubauer, se dejó sedimentar 5 minutos y se contaron los espermatozoides dentro de los campos definidos en la cámara (5 cuadrantes), mediante el uso de un microscopio de contraste de fases a 400X, la cantidad de espermatozoides observados se multiplicó por el factor correspondiente (106). La concentración de espermatozoides fue expresada en millones/ml.

1.Fertilidad: Durante los días 60-65 de tratamiento se colocaron en la noche (20:00-21:00 horas) 01 ratón macho con dos hembras vírgenes de seis semanas de edad en fase de estro o celo durante toda la noche y a la mañana siguiente (9:00- 10:00 horas) se visualizó la presencia o ausencia del tapón vaginal, la presencia del tapón vaginal fue considerado como día 1 de preñez. Las ratonas preñadas se sacrificaron al cuarto de día de gestación, posteriormente se perfusionaron los cuernos uterinos y oviductos, se recuperaron los embriones para evaluar: desarrollo, calidad y grado de blastulación.

Obtención y evaluación de embriones preimplantacionales: Las ratonas con 4 días de preñez fueron eutanizadas mediante dislocación cervical. Se disectaron los cuernos uterinos y oviductos para la obtención y evaluación de sus embriones y los ovarios para el recuento de cuerpos lúteos.

Evaluación de embriones: Los cuernos uterinos y oviductos se perfusionaron con medio de cultivo Flushing (MediCult®, Copenhagen, Dinamarca), para la obtención de los embriones. Posteriormente se evaluó: desarrollo embrionario, calidad embrionaria y grado de blastulación.

Desarrollo de los embriones: Se clasificaron de acuerdo al estadio de desarrollo embrionario preimplantacional<sup>(26)</sup>:

Estadío retardado: Menos de 9 células por embrión.  
Mórula: Más de 8 células con signos de compactación.  
Estadío de blastocisto: Más de 32 células compactas y presencia de blastocele.

Calidad de los embriones: Se utilizó un sistema de gradación de embriones propuesto por Dorn & Kramer<sup>(27)</sup> y descrita posteriormente por Dawson et al.<sup>(26)</sup> Este método clasifica a los embriones en cuatro categorías diferentes:

Grado I: El embrión presenta blastómeros homogéneos, simétricos y sin fragmentación.  
Grado II: El embrión presenta algunos blastómeros libres pudiendo tener presencia de algunos fragmentos de citoplasma.  
Grado III: El embrión presenta blastómeros libres, asimétricos con malformaciones severas.  
Grado IV o degenerados: El embrión tiene forma de tazón, casi no se observan blastómeros definidos y presenta membrana celular rota.

Grado de Blastulación: Según el tamaño del blastocelo los embriones se clasificaron de la siguiente manera:

Blastocisto Inicial: Blastocelo ocupa menos del 30% del tamaño del embrión.

Blastocisto Intermedio: Blastocelo ocupa entre 30% y el 50% del tamaño del embrión.

Blastocisto Avanzado: Blastocelo ocupa entre 50% y el 90% del tamaño del embrión.

Blastocisto Expandido: Blastocelo ocupa más del 90% del tamaño del embrión.

### Análisis Estadístico

Se comprobó homocedasticidad (igualdad de varianzas) de los datos mediante el Test de Levene. Para comprobar si los datos obtenidos de las distintas variables a evaluar se distribuían normalmente se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Cuando la variable a evaluar presentaba distribución normal se procedía

comparar las medias con t-Student, en caso contrario se aplicó U de Mann-Whitney para pruebas no paramétricas. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  EE (error estándar). Se usó el programa estadístico SPSS Ver 17.00, considerando el nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ .

### Aspectos éticos

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

## RESULTADOS

### Peso corporal y órganos reproductivos.

No se observaron diferencias significativas en el incremento del peso corporal, peso de los testículos, epidídimos, conductos deferentes y próstata ( $p > 0,05$ ) entre ambos grupos. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Peso corporal y de órganos reproductivos.

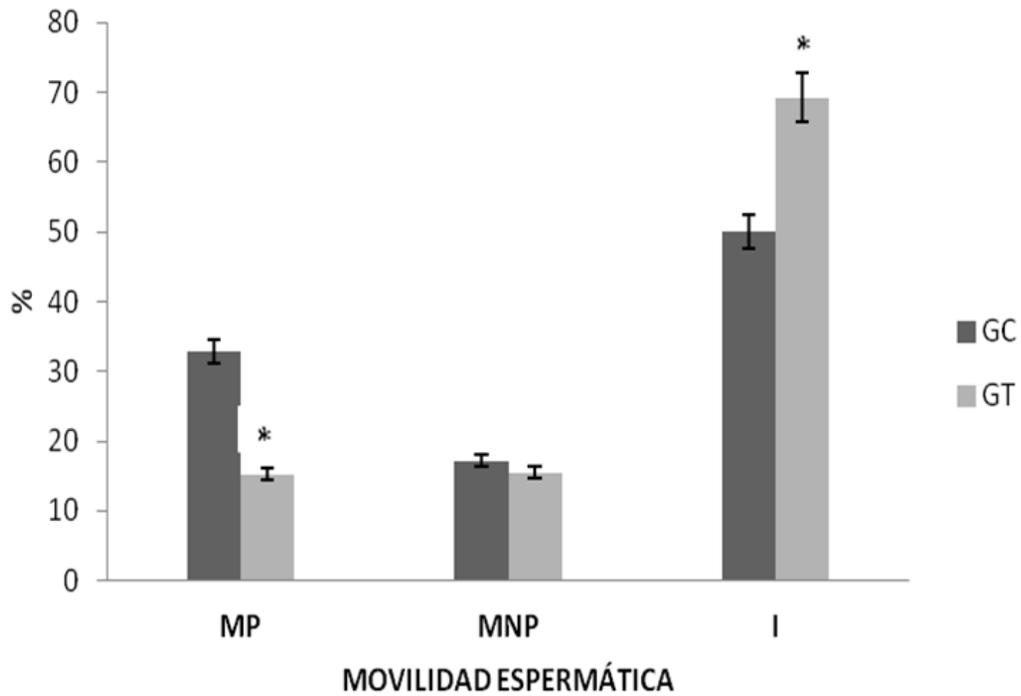
	GC	GT
n	8	8
Peso testículo izquierdo	0,1066 $\pm$ 0,0054	0,1180 $\pm$ 0,0058
Peso epidídimo izquierdo	0,0401 $\pm$ 0,0012	0,0410 $\pm$ 0,0013
Peso conducto deferente izquierdo	0,0133 $\pm$ 0,0010	0,0137 $\pm$ 0,0030
Peso testículo derecho	0,1121 $\pm$ 0,0046	0,1239 $\pm$ 0,0062
Peso epidídimo derecho	0,0413 $\pm$ 0,0012	0,0424 $\pm$ 0,0014
Peso conducto deferente derecho	0,0138 $\pm$ 0,0010	0,0138 $\pm$ 0,0005
Peso Próstata	0,0513 $\pm$ 0,0022	0,0428 $\pm$ 0,0029

GC: Grupo control 0 mg/kg MM y GT: Grupo tratado 1000 mg/kg MM. Media  $\pm$  EE; analizado por t-Student.

### Movilidad y concentración espermática

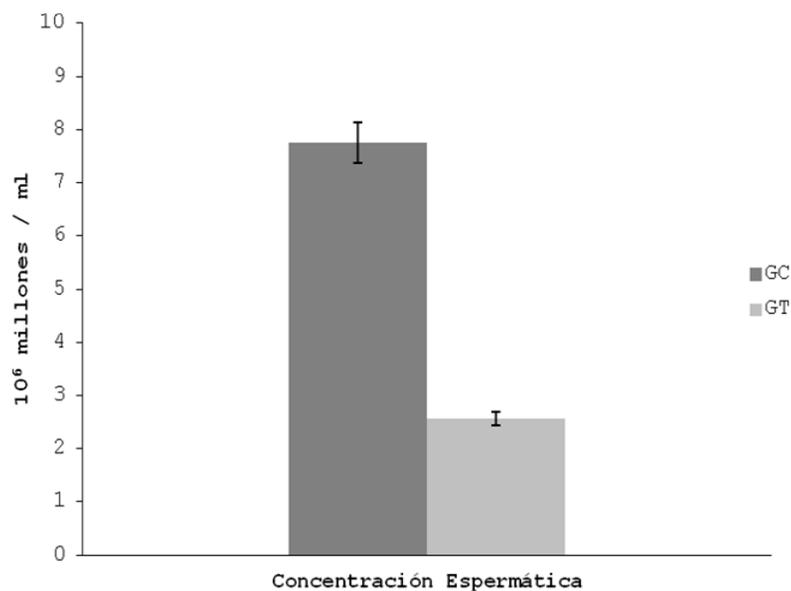
En el GT respecto al GC, la MP disminuyó significativamente ( $15,27 \pm 2,08$  vs.  $32,81 \pm 4,17$ ,  $p < 0.05$ ) y los espermatozoides inmóviles aumentaron

significativamente ( $69,25 \pm 4,17$  vs.  $50,05 \pm 3,77$ ,  $p < 0.05$ ). La MNP no fue alterada ( $17,14 \pm 3,48$  vs.  $15,48 \pm 3,09$ ,  $p > 0.05$ ) entre ambos grupos. Figura 1.



**Figura 1.** Movilidad espermática en ambos grupos (WHO 2010). MP = Movilidad progresiva, MNP = Movilidad no Progresiva e I = Inmóvil. \* Indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) después del análisis t – Student.

Respecto a la concentración espermática en la cola del epidídimo, disminuyó en el GT respecto al GC ( $2,56 \pm 0,42$  vs.  $7,75 \pm 0,34$ ,  $p < 0.05$ ). Figura 2.



**Figura 2.** Concentración espermática en ambos grupos. \* Indica diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) después de análisis t – Student. ml = mililito.

## Fertilidad

Del GC el 87,5% (7/8) de machos preñaron hembras y machos preñaron hembras produciendo cuatro produjeron 15 camadas y del GT sólo el 50% (4/8) de camadas (Tabla 2).

**Tabla 2.** Evaluación de la fertilidad en ambos grupos.

	GC	GT
Fertilidad	87,5 (7/8)	50,0 (4/8)
Hembras Preñadas	15	4
Embriones por Camada	9,27 ± 0,66	9,75 ± 1,11

GC: Grupo control 0 mg/kg MM y GT: Grupo tratado 1000 mg/kg MM. Media ± EE.

Las evaluaciones de las hembras preñadas se resumen en la Tabla 3.

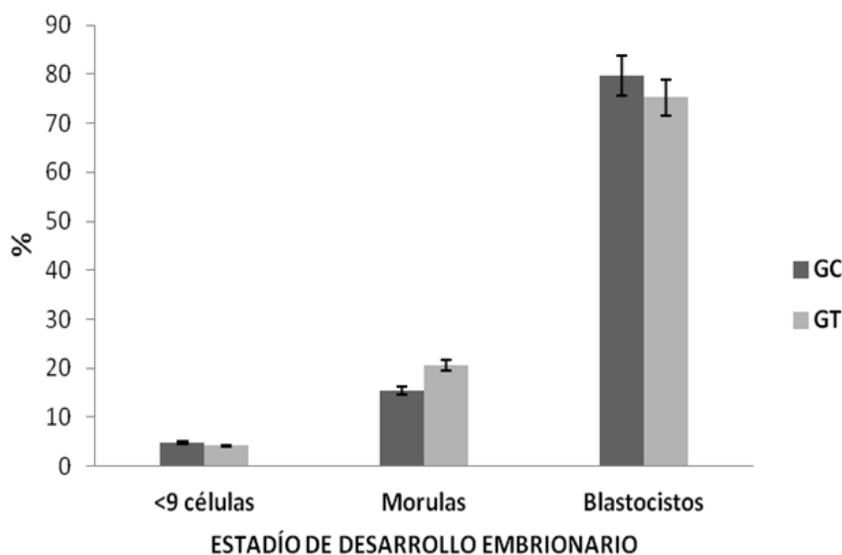
**Tabla 3.** Características de las hembras.

	GC	GT
Número de hembras evaluadas	15	4
Número total de embriones analizados	139	39
Número de cuerpos lúteos	10,26 ± 0,50	11,25 ± 0,85
Número de embriones por camada	9,26 ± 0,65	9,75 ± 1,10

GC: Grupo control 0 mg/kg MM y GT: Grupo tratado 1000 mg/kg MM. Media ± EE; analizado por t-Student.

Si bien el extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa* disminuyó la fertilidad debido que un menor número de machos consiguió preñar (Tabla 2 y Tabla 3), la calidad, el desarrollo y el grado de blastulación no difirieron entre ambos grupos (Figura 3, 4 y 5). En cuanto a los embriones obtenidos, no se encontraron

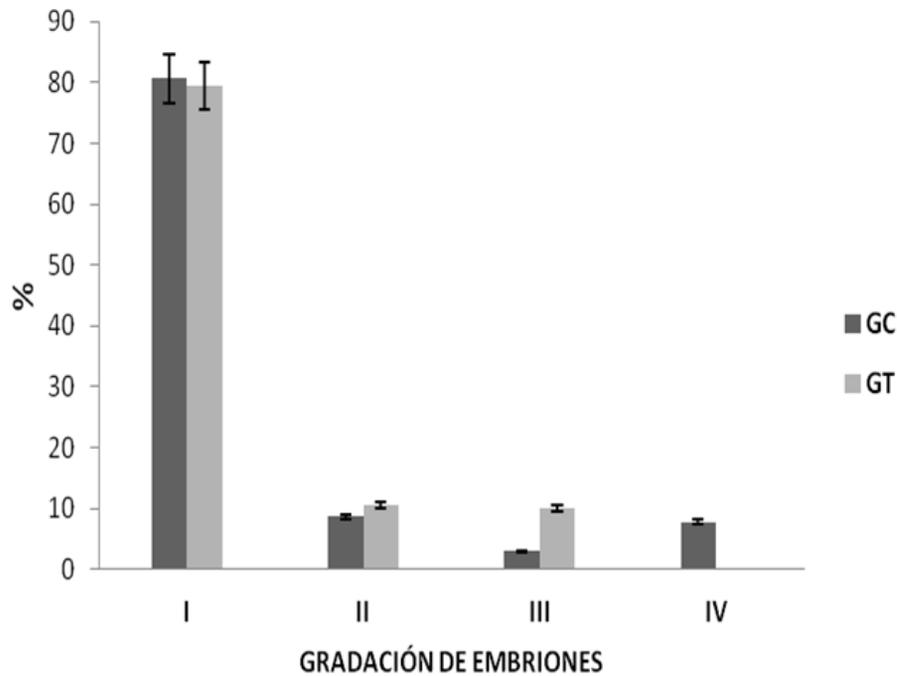
diferencias significativas en el porcentaje de blastocistos (79,69 ± 5,25 % vs. 75,23 ± 12,00 %), mórulas (15,42 ± 4,30 % vs. 20,61 ± 9,55 %) y embriones con menos de 9 células (4,87 ± 2,40 % vs. 4,17 ± 1,35 %) entre el GC y el GT, respectivamente (p>0.05). (Figura 3)



**Figura 3.** Desarrollo embrionario. GC: Grupo control 0 mg/kg MM y GT: Grupo tratado 1000 mg/kg MM. Media ± EE; analizado por U de Mann-Whitney.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de embriones de grado I ( $80,64 \pm 5,28$  % vs.  $79,40 \pm 9,55$  %), grado II ( $8,63 \pm 2,36$  % vs.  $10,61 \pm 7,87$

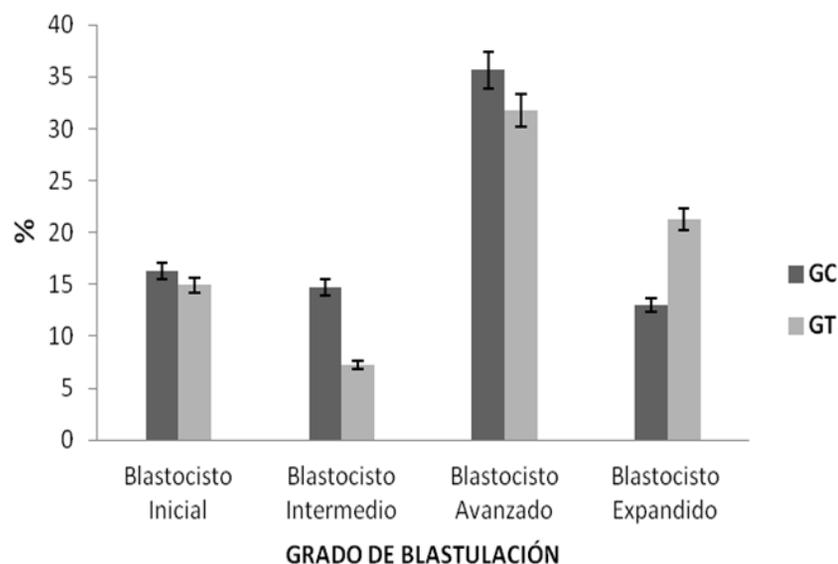
%), grado III ( $2,96 \pm 2,96$  % vs.  $10,00 \pm 10,00$  %) y grado IV o degenerado ( $7,76 \pm 3,69$  % vs.  $0,00 \pm 0,00$  %) entre el GC y el GT, respectivamente ( $p > 0,05$ ) (Figura 4).



**Figura 4.** Gradación embrionaria. GC: Grupo control 0 mg/kg MM y GT: Grupo tratado 1000 mg/kg MM. Media  $\pm$  EE; analizado por U de Mann-Whitney.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de blastocistos: iniciales ( $16,29 \pm 5,82$  % vs.  $14,91 \pm 3,61$  %), intermedios ( $14,72 \pm 4,40$  % vs.  $7,27$

$\pm 4,75$  %), avanzados ( $35,63 \pm 5,08$  % vs.  $31,77 \pm 8,62$  %) y expandidos ( $13,05 \pm 4,24$  % vs.  $21,28 \pm 12,00$  %) ( $p > 0,05$ ) (Figura 5)



**Figura 5.** Grado de blastulación embrionaria. GC: Grupo control 0 mg/kg MM y GT: Grupo tratado 1000 mg/kg MM. Media  $\pm$  EE; analizado por U de Mann-Whitney.

## DISCUSIÓN

El presente estudio investigó el efecto de *Maytenus macrocarpa* sobre parámetros reproductivos y fertilidad en ratones. Se ha postulado el uso de algunas plantas como anticonceptivos masculinos<sup>(2,3,5)</sup>, debiendo ejercer un efecto localizado a nivel del sistema reproductivo, y no un efecto sistémico que pueda alterar otras funciones fisiológicas<sup>(28,29,30)</sup>. El presente trabajo sugiere la acción directa de *Maytenus macrocarpa* sobre el sistema reproductivo debido a que no existe modificación del peso corporal (Tabla 1,  $p > 0.05$ ), mientras que los valores de movilidad y concentración espermática disminuyeron (Figura 1 y 2, respectivamente,  $p < 0.05$ ), además la fertilidad también disminuyó después del tratamiento con *Maytenus macrocarpa* (Tabla 2). Los testículos, epidídimos y próstata son órganos dependientes de andrógenos<sup>(31)</sup>, no observamos modificación de sus pesos por lo cual *Maytenus macrocarpa* no estaría ejerciendo un efecto anti-androgénico sobre el sistema reproductor masculino<sup>(32)</sup>.

Las especies del género *Maytenus* poseen gran cantidad de metabolitos fenólicos como triterpenos<sup>(12,13)</sup> y flavonoides<sup>(14)</sup>, justificando su potente acción anti-inflamatoria<sup>(33,34)</sup>. En base a nuestros resultados, se sugiere que estas moléculas podrían ser las responsables de la disminución de los parámetros reproductivos al estar reportado que moléculas triterpenos inhiben fuertemente la movilidad espermática<sup>(35)</sup> y detienen la espermatogénesis en ratas<sup>(36)</sup> además de poseer un potente efecto inhibitorio sobre la prostaglandina E2<sup>(37)</sup>; esta molécula lipídica es de gran importancia sobre la movilidad espermática<sup>(38)</sup> al incrementarla<sup>(39)</sup>, además induce la entrada de calcio en el espermatozoide previo a la reacción acrosomal<sup>(40)</sup>. A su vez, los flavonoides han mostrado inhibir la movilidad espermática<sup>(35)</sup> y la actividad acrosomal<sup>(41)</sup>. También se han reportado nor-triterpenos conocidos como macrocarpinas en *Maytenus macrocarpa* quienes poseen fuerte actividad citotóxica<sup>(22)</sup>, por lo cual estas moléculas también podrían ser responsables de la disminución de las características reproductivas después de la ingesta de *Maytenus macrocarpa*.

A diferencia de nuestros resultados, Montanari et al.<sup>(24)</sup> observaron mediante cortes histológicos de testículos de ratón, que la ingesta de dosis diarias de 800 mg/kg pc del extracto etanólico de *M. ilicifolia* por 30 días no alteraba la espermatogénesis lo cual nos podría

podría indicar que la acción de *Maytenus macrocarpa* podría ser a nivel post-testicular, es decir durante el tránsito de los espermatozoides por el epidídimo. Otras posibilidades son que el efecto de las plantas del género *Maytenus* sea especie-específico y/o propio del tipo de extracto que se use al reportarse en otras plantas distintos tipos de acción de acuerdo al extracto utilizado<sup>(42)</sup>. Debido a que nosotros usamos un extracto acuoso y Montanari et al.<sup>(24)</sup> un extracto etanólico sugerimos que uno o más compuestos altamente polares serían los responsables de los efectos anti-reproductivos observados.

El tiempo de dosis (30 días) que usaron Montanari et al.<sup>(24)</sup> no sería la causa por la cual no se observaron efectos sobre la espermatogénesis debido a que en un trabajo previo<sup>(43)</sup> observamos que la ingesta por tan sólo 7 días de *Maytenus macrocarpa* disminuía la calidad espermática en ratones, esto apoyaría nuestra observación que *Maytenus macrocarpa* ejercería su efecto sobre la espermiación y el transporte en el epidídimo debido a que estos fenómenos transcurren en un periodo de 7 días<sup>(44)</sup>.

Si bien las deficiencias citoplasmáticas del espermatozoide pueden ser detectadas tan temprano como en un embrión de una célula<sup>(45)</sup>, las deficiencias que ocurren a nivel genómico del espermatozoide no puede ser detectado en el embrión antes del estadio de 8 células en el desarrollo del embrión<sup>(46,47)</sup>, debido a esto, decidimos evaluar el embrión en estadio de blastocisto. Se ha encontrado una relación entre la integridad genética del espermatozoide y el clivaje durante el proceso de desarrollo del embrión<sup>(48,49)</sup> y la ausencia de efectos negativos en los estadios de blastocistos del Grupo Tratamiento que corresponde a hembras preñadas que podría indicar que la ingesta del extracto acuoso de *M. macrocarpa* no afecta la integridad genética del espermatozoide, permitiendo un desarrollo embrionario normal. Estos resultados están en concordancia con estudios previos donde no existe efecto tóxico en especies del género *Maytenus*<sup>(50,52)</sup>, por otra parte se ha reportado propiedades antimutagénicas en el género *Maytenus*<sup>(17)</sup>.

Muchos anticonceptivos obtenidos de plantas actúan disminuyendo la movilidad y concentración espermática en la cola del epidídimo<sup>(28,29)</sup>, características de gran importancia para el éxito reproductivo<sup>(53)</sup>, tal como se observó con el extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa*.

Las limitaciones del estudio fueron principalmente de orden logístico institucional; como cortes de luz o cierre intempestivo de la universidad que impidieron dosificación o evaluación en el momento acordado, teniendo que repetir de nuevo toda la dosificación.

## CONCLUSIÓN

La ingesta del extracto acuoso de *Maytenus macrocarpa* podría disminuir la movilidad y concentración espermática, así como la fertilidad en ratones. En cuanto a los embriones obtenidos, no se

encontraron diferencias significativas entre los estadios estudiados. Es evidente que se necesitan más estudios para identificar que compuestos serían los responsables de sus efectos anti-reproductivos.

**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 del manuscrito.

**Conflictos de intereses:** Los autores declaran no tener conflictos de interés.

**Recibido:** 06 de mayo, 2022

**Aprobado:** 25 de agosto, 2022

**Financiamiento:** Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Proyecto Multidisciplinario Grant # PEM2008A02).

**Correspondencia:** José Luis Rafael Pino Gaviño.

**Dirección:** Av. German Amézaga 375, Cercado, Lima, Perú.

**Teléfono:** 992169186

**Email:** jpinog@unmsm.edu.pe

## REFERENCIAS

- D'Cruz SC, Vaithinathan S, Jubendradass R, Mathur PP. Effects of plants and plant products on the testis. *Asian J Androl.* 2010;12:468-79. DOI: [10.1038/aja.2010.43](https://doi.org/10.1038/aja.2010.43) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3739374/>
- Ashok P, Meenakshi B. Contraceptive effect of *Curcuma longa* (L.) in male albino rat. *Asian J Androl.* 2004;6:71-4. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15064838/>
- Gupta RS, Kachhawa JB, Chaudhary R. Antifertility effects of methanolic pod extract of *Albizia lebbek* (L.) Benth in male rats. *Asian J Androl.* 2004;6:155-9. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15154091/>
- Lohiya NK, Manivannan B, Mishra PK, et al. Chloroform extract of *Carica papaya* seeds induces long-term reversible azoospermia in langur monkey. *Asian J Androl.* 2002;4:17-26. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11907624/>
- Gupta RS, Sharma RA. A review on medicinal plants exhibiting antifertility activity in males. *Nat Prod Radiance.* 2006;5:389-410. <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/8007/1/NPR%205%285%29%20389-410.pdf>
- World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>
- Palacios EE. Economía y plantas medicinales. UNMSM CSI Boletín. 2004;52:28-31. <https://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/publicaciones/consejo/boletin52/Pdf/a04.pdf>
- Mejía K, Rengifo E. Plantas Medicinales de uso popular en la Amazonia Peruana. Lima: Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana - Gobierno Regional de Loreto - Agencia Española de Cooperación Internacional, 2ª ed., 2000. 286 págs. ISBN: 9972-614-00-5. <https://www.fitoterapia.net/publicaciones/documentacion/protective-effect-ispirulina-maximai-male-302.html>
- León B. Celastraceae endémicas del Perú. *Rev peru biol.* 2006;13:255. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332006000200035](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332006000200035)
- Stevens AM. ANGIOSPERM PHYLOGENY WEBSITE, version 12. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/St.Louis2001>.
- Bueno NR, Castilho RO, Costa RBd, et al. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guarani indigenous populations in the Caarapó Reserve, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Acta Botanica Brasílica.* 2005;19:39-44. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062005000100005> <https://www.scielo.br/j/abb/a/rzbd4pddRvJYCbFvPNXsND/?lang=em>
- Itokawa H, Shirota O, Ikuta H, Morita H, Takeya K, Iitaka Y. Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry.* 1991;30:3713-6. DOI: [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)80096-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80096-J) <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003194229180096>
- Shirota O, Morita H, Takeya K, Itokawa H. Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus chuchuhuasca*. *J Nat Prod.* 1994;57:1675-81. doi: 10.1021/np50114a009. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7714534/>
- Leite JP, Rastrelli L, Romussi G, et al. Isolation and HPLC quantitative analysis of flavonoid glycosides from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *M. aquifolium*). *J Agric Food Chem.* 2001;49:3796-801. DOI: [10.1021/jf010294n](https://doi.org/10.1021/jf010294n) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11513669/>
- Jorge RM, Leite JP, Oliveira AB, Tagliati CA. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antitumor activities of *Maytenus ilicifolia*. *J Ethnopharmacol.* 2004;94:93-100. doi: 10.1016/j.jep.2004.04.019 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15261968/>
- Velloso JC, Khalil NM, Formenton VA, et al. Antioxidant activity of *Maytenus ilicifolia* root bark. *Fitoterapia.* 2006;77:243-4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.02.007> <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X06000451>
- Bruni R, Rossi D, Muzzoli M, et al. Antimutagenic, antioxidant and antimicrobial properties of *Maytenus krukovii* bark. *Fitoterapia.* 2006;77:538-45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.06.009> <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367326X06001705>
- Gonzalez FG, Portela TY, Stipp EJ, Di Stasi LC. Antitumor and analgesic effects of *Maytenus aquifolium*, *Sorocea bomplandii* and *Zolernia ilicifolia*. *J Ethnopharmacol.* 2001;77:41-7. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00268-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00268-9) <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874101002689>
- Gessler MC, Tanner M, Chollet J, Nkunya MHH, Heinrich M. Tanzanian medicinal plants used traditionally for the treatment of malaria: In vivo antimalarial and in vitro cytotoxic activities. *Phytotherapy Research.* 1995;9:504-8. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.2650090708> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.2650090708>
- Otake T, Mori H, Morimoto M, et al. Screening of Indonesian plant extracts for anti-human immunodeficiency virus—type 1 (HIV-1) activity. *Phytotherapy Research.* 1995;9:6-10. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.2650090103> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ptr.2650090103>
- Matu EN, van Staden J. Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *J Ethnopharmacol.* 2003;87:35-41. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00107-7) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12787952/>
- Chavez H, Rodriguez G, Estevez-Braun A, et al. Macrocarpines A-D, new cytotoxic nor-triterpenes from *Maytenus macrocarpa*. *Bioorg Med Chem Lett.* 2000;10:759-62. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00082-2](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00082-2) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10782680/>
- Kloucek P, Svobodova B, Polesny Z, Langrova I, Smercek S, Kokoska L. Antimicrobial activity of some medicinal barks used in Peruvian Amazon. *J Ethnopharmacol.* 2007;111:427-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.010> <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378874106005964>
- Montanari T, de Carvalho JE, Dolder H. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss on spermatogenesis. *Contraception.* 1998;57:335-9. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(98\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(98)00038-9) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9673841/>
- Montanari T, Bevilacqua E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. *Contraception.* 2002;65:171-5. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0010-7824\(01\)00301-8](https://doi.org/10.1016/S0010-7824(01)00301-8) <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010782401003018#:~:text=C&oncerning%20the%20reproductive%20parameters%2C%20the,loss%20before%20the%20implantation%20period>
- Dawson KJ, Conaghan J, Otera GR, Winston RM, Hardy K. Delaying transfer to the third day post-insemination, to select non-arrested embryos, increases development to the fetal heart stage. *Hum Reprod.* 1995;10:177-82. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/10.1.177> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7745051/>
- Dorn CG, Kraemer DC. Bovine embryo grading. Texas: Texas A & M University; 1987.



28. Sharma N, Jacob D. Antifertility investigation and toxicological screening of the petroleum ether extract of the leaves of *Mentha arvensis* L. in male albino mice. *J Ethnopharmacol.* 2001;75:5-12. DOI: [10.1016/S0378-8741\(00\)00362-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00362-7) [https://www.researchgate.net/publication/12051967\\_Antifertility\\_investigation\\_and\\_toxicological\\_screening\\_of\\_the\\_petroleum\\_ether\\_extract\\_of\\_the\\_leaves\\_of\\_Mentha\\_arvensis\\_L\\_in\\_male\\_albino\\_mice](https://www.researchgate.net/publication/12051967_Antifertility_investigation_and_toxicological_screening_of_the_petroleum_ether_extract_of_the_leaves_of_Mentha_arvensis_L_in_male_albino_mice)
29. Venma PK, Sharma A, Mathur A, et al. Effect of *Sarcostemma acidum* stem extract on spermatogenesis in male albino rats. *Asian J Androl.* 2002;4:43-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11907627/#:~:text=Results%3A%20S,at%20the%20100%20mg%20dose.>
30. Gupta RS, Kumar P, Dixit VP, Dobhal MP. Antifertility studies of the root extract of the *Barleria prionitis* Linn in male albino rats with special reference to testicular cell population dynamics. *J Ethnopharmacol.* 2000;70:111-7. DOI: [10.1016/S0378-8741\(99\)00150-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00150-6) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10771200/>
31. Trentacoste SV, Friedmann AS, Youker RT, Breckenridge CB, Zirkin BR. Atrazine effects on spermatogenesis and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. *J Androl.* 2001;22:142-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11191080/>
32. Manivannan B, Mittal R, Goyal S, Ansari AS, Lohiya NK. Sperm characteristics and ultrastructure of testes of rats after long-term treatment with the methanol subfraction of *Carica papaya* seeds. *Asian J Androl.* 2009;11:583-99. doi: [10.1038/aja.2009.25](https://doi.org/10.1038/aja.2009.25) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3735006/>
33. Santos VLd, Costa VBM, Agra Mdf, Silva BAD, Batista LM. Pharmacological studies of ethanolic extracts of *Maytenus rigida* Mart (Celastraceae) in animal models. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2007;17:336-42. doi.org/10.1590/S0102-695X20070007000030000006 <https://www.scielo.br/j/rbfar/a/v9Wx77rbYpDWM6TptbHGPY/?lang=en>
34. Gonzalez-Gallego J, Sanchez-Campos S, Tunon MJ. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp.* 2007;22:287-93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17612370/>
35. Chattopadhyay D, Dungdung SR, Mandal AB, Majumder GC. A potent sperm motility-inhibiting activity of bioflavonoids from an ethnomedicine of Onge, *Alstonia macrophylla* Wall ex A. DC, leaf extract. *Contraception.* 2005;71:372-8. doi.org/10.1016/j.contraception.2004.11.006 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0010782404003099?via=ihIub>
36. Chaudhary R, Gupta RS, Kachhaw JBS, Singh D, Verma SK. Inhibition of Spermatogenesis by Triterpenes of *Albizia lebeck* (L) Benth Pods in Male Albino Rats 2007; 7:86-93. doi.org/10.18311/jnr/2007/199 <https://www.informaticsjournals.com/index.php/jnr/article/view/199/199>
37. Reyes CP, Nunez MJ, Jimenez IA, Busserolles J, Alcaraz MJ, Bazzocchi IL. Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2. *Bioorg Med Chem.* 2006;14:1573-9. DOI: [10.1016/j.bmc.2005.10.063](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.10.063) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16337130/>
38. Schlegel W, Rotermund S, Farber G, Nieschlag E. The influence of prostaglandins on sperm motility. *Prostaglandins.* 1981;21:87-99. doi.org/10.1016/0090-6980(81)90199-4 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0090698081901994>
39. Didolkar AK, Roychowdhury D. Effects of prostaglandins E-1, E-2, F-1a and F-2a on human sperm motility. *Andrologia.* 1980;12:135-40. DOI: [10.1111/j.1439-0272.1980.tb00597.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1980.tb00597.x) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6446248/>
40. Shimizu Y, Yorimitsu A, Maruyama Y, Kubota T, Aso T, Bronson RA. Prostaglandins induce calcium influx in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1998;4:555-61. DOI: [10.1093/molehr/4.6.555](https://doi.org/10.1093/molehr/4.6.555) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9665338/>
41. Taitzoglou IA, Tsantariotou M, Zervos I, Kouretas D, Kokolis NA. Inhibition of human and ovine acrosomal enzymes by tannic acid in vitro. *Reproduction.* 2001;121:131-7. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11226036/>
42. Aguilar JL, Rojas P, Marcelo A, et al. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol.* 2002;81:271-6. DOI: [10.1016/S0378-8741\(02\)00093-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(02)00093-4) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12065162/>
43. Acosta L, Vasquez J, Núñez V, Pino J, Shiga B. Efecto de *Maytenus macrocarpa* "Chuchuhuasi" en el sistema reproductor masculino del ratón (*Mus musculus*). *Revista Peruana de Biología* 2014;20(3):223-226. DOI: [10.15381/rpb.v20i3.5219](https://doi.org/10.15381/rpb.v20i3.5219)
44. Pina-Guzman B, Solis-Heredia MJ, Quintanilla-Vega B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;202:189-98. DOI: [10.1016/j.taap.2004.06.028](https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.06.028) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15629194/>
45. Tesarik J, Greco E, Mendoza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2004;19:611-5. doi.org/10.1093/humrep/deh127 <https://academic.oup.com/humrep/article/19/3/611/658471>
46. Tesarik J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod Biomed Online.* 2005;10:370-5. doi.org/10.1016/S1472-6483(10)61798-1 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1472648310617981>
47. Vanderzwalmen P, Hiemer A, Rubner P, et al. Blastocyst development after sperm selection at high magnification is associated with size and number of nuclear vacuoles. *Reprod Biomed Online.* 2008;17:617-27. DOI: [10.1016/s1472-6483\(10\)60308-2](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60308-2) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18983745/>
48. Aitken RJ, De Lullis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reprod Biomed Online.* 2007;14:727-33. DOI: [10.1016/S1472-6483\(10\)60676-1](https://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60676-1) [https://www.researchgate.net/publication/6257212\\_Origins\\_and\\_consequences\\_of\\_DNA\\_damage\\_in\\_male\\_germ\\_cells](https://www.researchgate.net/publication/6257212_Origins_and_consequences_of_DNA_damage_in_male_germ_cells)
49. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. *Hum Reprod Update.* 2005;11:337-49. doi.org/10.1093/humupd/dmi011 <https://academic.oup.com/humupd/article/11/4/337/874979>
50. Camparoto ML, Teixeira RdO, Mantovani MS, Vicentini VEP. Effects of *Maytenus ilicifolia* Mart. and *Bauhinia candicans* Benth infusions on onion root-tip and rat bone-marrow cells. *Genetics and Molecular Biology.* 2002;25:85-9. <https://www.scielo.br/j/gmb/a/F99FZPqXmTjYrP3BPmwHR9b/?format=pdf&lang=en>
51. Mota KSdL, Pita JCLR, Estevam EC, et al. Evaluation of the toxicity and antiulcerogenic activity of the ethanol extract of *Maytenus obtusifolia* Mart. leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2008;18:441-6. DOI: [10.1590/S0102-695X2008000300019](https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300019) [https://www.researchgate.net/publication/247854762\\_Evaluation\\_of\\_the\\_toxicity\\_and\\_antiulcerogenic\\_activity\\_of\\_the\\_ethanol\\_extract\\_of\\_Maytenus\\_obtusifolia\\_Mart\\_leaves](https://www.researchgate.net/publication/247854762_Evaluation_of_the_toxicity_and_antiulcerogenic_activity_of_the_ethanol_extract_of_Maytenus_obtusifolia_Mart_leaves)
52. da Silva G, Tanica M, Rocha J, et al. In vivo anti-inflammatory effect and toxicological screening of *Maytenus heterophylla* and *Maytenus senegalensis* extracts. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30:693-700. DOI: [10.1177/0960327110379242](https://doi.org/10.1177/0960327110379242) <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20670987/>
53. Bedford JM. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod.* 1983;28:108-20. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302615420>

