



EFFECTO DEL CONSUMO DEL EXTRACTO DEL FRUTO DE “CAMU CAMU” EN LA INTEGRIDAD DEL ADN ESPERMÁTICO DE RATONES PRETRATADOS CON DOSIS UNICA DE CICLOFOSFAMIDA

EFFECT OF CONSUMPTION OF THE FRUIT EXTRACT OF “CAMU CAMU” ON THE INTEGRITY OF THE SPERM DNA OF MICE PRETREATED WITH UNIQUE DOSE OF CYCLOPHOSPHAMIDE

Jose Luis Pino Gaviño ^{1,2,a}, Carlos Bell Cortez ^{1,3,b}, Pilar Valeria Pino Velasquez ^{1,4}, Jacquelyne Zarría Romero ^{1,c}, Nilda Oliveros Rodriguez ^{1,4,a}, Betty Shiga Oshige ^{1,2,e}

RESUMEN

Introducción: Myrciaria dubia conocido como “camu camu” es una fruta que crece en la Amazonía y tiene como principal característica su alto contenido de vitamina C o ácido ascórbico, el cual tiene el rol de protección en la espermatogénesis por ser un compuesto con excelente acción reductora. El proposito de esta investigación fue evaluar la capacidad citoprotectora in vivo del extracto acuoso del fruto de Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh “camu-camu” frente al daño mutagénico producido por el antineoplásico ciclofosfamida (CP) sobre la línea germinal masculina. **Métodos:** Se utilizaron ratones (n= 60) divididos en cinco grupos tratamiento: T1= control negativo (sin tratamientos); T2 ingirió el extracto acuoso (10mgkg-1), T3 ingirió el extracto acuoso (50mgkg-1), T4 ingirió el extracto acuoso (100mgkg-1); T5 es el control positivo (se le administró solamente CP). A todos se inyectaron una dosis única de CP (50 mgkg-1) vía intraperitoneal. El tratamiento con camu-camu continuó por 45 días, luego los ratones fueron eutanizados para determinar la calidad espermática y la frecuencia del daño al ADN mediante el protocolo de índice de fragmentación de ADN espermático – protocolo Halomax. **Resultados:** Se observó en todos los ensayos el efecto del extracto de camu-camu (p< 0,05) respecto al control. El grupo T4, el cual se administró la mayor concentración del extracto acuoso del fruto (100 mgkg-1), evidenció el mayor efecto citoprotector del camu-camu (p< 0,05). **Conclusión:** El efecto dañino al ADN por la acción oxidativa del CP podría estar siendo inhibido o modulado por el extracto acuoso del fruto de “camu camu”.

Palabras clave: Camu-camu; Myrciaria dubia; Ciclofosfamida; Fragmentación del ADN; Ratón; Semen. (Fuente: DeCS-BIREME)

ABSTRACT

Introduction: Myrciaria dubia known as “camu camu” is a fruit that grows in the Amazon and its main characteristic is its high content of vitamin C. Ascorbic acid has a protective role in spermatogenesis as it is a compound that has excellent reducing action. The purpose of this research was to evaluate in vivo the cytoprotective capacity of the aqueous extract of the fruit of Myrciaria dubia (Kunth) McVaugh “camu-camu” against the mutagenic damage produced by the antineoplastic drug cyclophosphamide (CP) on the male germ line. **Methods:** Mice (n= 60) were divided into five treatment groups: T1= negative control (without treatment); T2 ingested the aqueous extract (10mgkg-1), T3 ingested the aqueous extract (50mgkg-1), T4 ingested the aqueous extract (100mgkg-1); T5 is the positive control. All of them were injected with a single dose of CP (50 mgkg-1) intraperitoneally. Treatment with camu-camu continued for 45 days, then the mice were euthanized to determine sperm quality and the frequency of DNA damage using the Index protocol. Sperm DNA fragmentation – Halomax protocol. **Results:** The effect of camu-camu extract was observed in all trials (p< 0.05) compared to the negative control. Group T4, which was administered the highest concentration of the aqueous extract of the fruit, evidenced the cytoprotective effect of camu-camu (p< 0.05). **Conclusion:** The damaging effect on DNA due to the oxidative action of CP could be inhibited by the aqueous extract of the “camu camu” fruit.

Keywords: Camu-camu; Myrciaria dubia; Cyclophosphamide; DNA fragmentation; Mouse; Semen. (Source: MeSH – NLM)

¹ Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi, Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Lima – Perú.

² Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA). Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. UNMSM.

³ Laboratorio de Química Analítica, Instituto de Ciencias Farmacéuticas Y Recursos Naturales “Juan De Dios Guevara”. Facultad de Farmacia y Bioquímica. (UNMSM). Lima – Perú.

⁴ Laboratorio de Radiobiología, Instituto de Investigación de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi, Facultad de Ciencias Biológicas (UNMSM). Lima – Perú.

^a Biólogo.

^b Doctor en Farmacia y Bioquímica.

^c Doctor en Ciencias Biológicas.

^d Magíster en Procedimientos en Reproducción Asistida.

^e Magíster en Zoología.

Citar como: Pino Gaviño JL, Pino Velasquez PV, Bell Cortez C, Oliveros Rodriguez N, Zarría Romero J, Shiga Oshige B. Efecto del Consumo del Extracto del Fruto “Camu Camu” en la Integridad del ADN Espermático de Ratones Pretratados con Dosis Única de Ciclofosfamida. Rev Fac Med Hum. 2024;24(3):71-77. doi:10.25176/RFMH.v24i3.6682

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

La infertilidad es definida por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad del sistema reproductivo entendida como la incapacidad de lograr un embarazo clínico después de 12 meses o más de relaciones sexuales sin el empleo del algún método anticonceptivo⁽¹⁾. Esta condición afecta a casi un 20% de las parejas en edad reproductiva y se considera que el factor masculino contribuye con el 50% de los casos. El primer análisis que se hace un varón que acude a un centro de reproducción asistida para poder predecir su potencial fértil es el espermatograma que en resumen consiste en el análisis macroscópico y microscópico del fluido seminal. Adicionalmente hoy en día se están tomando en cuenta nuevas pruebas complementarias que evalúan otros aspectos de los espermatozoides como por ejemplo la integridad de su material genético⁽²⁾.

La importancia del análisis del ADN del espermatozoide radica en que diversos estudios han demostrado que la integridad del ADN en el espermatozoide afectaría los resultados clínicos en los tratamientos de reproducción asistida y que a pesar de los datos que brinda el espermatograma para evaluar la calidad espermática, aproximadamente un 10% a 15% de los varones diagnosticados con infertilidad presentan parámetros del espermatograma dentro de rangos normales aunque podrían presentar defectos en el ADN de los espermatozoides. La rotura de la hebra de ADN en los espermatozoides se atribuye a diversos motivos dentro de los cuales se encuentran la producción excesiva de radicales libres en el eyaculado, así como la exposición a factores ambientales, ocupacionales, y hábitos tóxicos⁽³⁾. Un alto daño del ADN espermático se ha correlacionado a infertilidad, desarrollo embrionario defectuoso, falla en la implantación y un incremento de abortos recurrentes⁽⁴⁾.

Ciclofosfamida (CP) [N, N-bis (2-cloroetil) tetrahidro-2H-1, 3,2 oxaza - fosforin-2-amino 2-oxido] es un agente alquilante comúnmente utilizado como fármaco antineoplásico e inmunosupresor. La citotoxicidad de la CP es mediada por la alquilación del ADN en la posición N7 de guanina y la formación de cross-links del tipo ADN-ADN y ADN-proteína, así como quiebres en una de las hebras del ADN⁽⁵⁻⁷⁾. La ciclofosfamida produce infertilidad al interrumpir la meiosis antes de la etapa de paquiteno produciendo así daño genotóxico en la línea germinal y deterioro en las células de Leydig⁽⁸⁻¹⁰⁾. Las

células eucariotas para mantener la estabilidad genética detienen su ciclo celular, lo cual, permite la activación de mecanismos de reparación del ADN⁽¹¹⁾, pero cuando el daño es severo se activan vías de muerte celular tal como la apoptosis⁽¹²⁾. La apoptosis describe un patrón morfológico único de muerte celular caracterizado por condensación de la cromatina, formación de rupturas en la membrana, y la fragmentación del ADN; este mecanismo, juega un papel importante en la homeostasis de organismos multicelulares. La función anormal de apoptosis se ha asociado a varias enfermedades humanas, incluyendo trastornos neurodegenerativos y cánceres.

"Camu camu" (*Myrciaria dubia*) es una fruta que crece en la Amazonía y tiene como principal característica su alto contenido de vitamina C o ácido ascórbico⁽¹³⁾. Se ha reportado que el ácido ascórbico tiene rol de protección en la espermatogénesis al ser un compuesto que tiene excelente acción reductora, en consecuencia se convierte en un buen antioxidante⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Hay reportes en los cuales se comprobó mediante el ensayo in vivo de micronúcleos en médula ósea de ratón, que el extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H. B. K. Mc Vaugh "camu camu", posee un efecto antimutagénico contra el daño producido por sales con fluor y que cuando se suministra anticipadamente tiene un efecto citoprotector en la misma línea celular⁽¹⁷⁾. Otro trabajo hecho en nuestro laboratorio comprobó el efecto protector de camu-camu de 3 líneas celulares tratadas previamente in vivo con bromato de potasio⁽¹⁸⁾.

Basados en la evidencia científica reportada se plantea como objetivo del presente trabajo de investigación, determinar si el "camu camu" puede revertir el efecto negativo de la CP sobre la línea germinal masculina en ratones, enfocando esta evaluación en el índice de fragmentación del ADN de los espermatozoides, los resultados logrados podrían ser extrapolados para su uso en humanos y de esa manera restablecer la fertilidad en pacientes que hallan requerido el uso de esta droga en su tratamiento contra el cáncer. El test Halomax es una técnica empleada para identificar y evaluar los espermatozoides que presentan daño en su ADN. Es decir, permite identificar aquellos espermatozoides que tienen su material genético (ADN) dañado y así diferenciarlos de los que no lo tienen. Este test permite establecer la proporción de espermatozoides con ADN fragmentado en el total de

muestra analizada. Se estima que, utilizando métodos de reproducción normales, un porcentaje de espermatozoides con ADN fragmentado superior al 30 % reduce o en algunos casos elimina la posibilidad de conseguir en embarazo a término.

El propósito de esta investigación fue evaluar in vivo la capacidad citoprotectora del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh "camu-camu" frente al daño mutagénico producido por el antineoplásico ciclofosfamida (CP) sobre la línea germinal masculina en ratones.

MÉTODOS

Diseño y área de estudio

Estudio preclínico experimental en el área de biología experimental.

Población y muestra

La muestra estuvo conformada por 60 ratones machos (*Mus musculus*) de la cepa albina BALB/c (entre 6 y 8 semanas de edad) obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Salud, en Lima-Perú. A los grupos de tratamiento de dosis de camu camu, se les administró el extracto acuoso mediante sonda nasogástrica N°18 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). Los ratones fueron mantenidos a condiciones estándar de bioterio: fotoperiodo de 14 horas (h) luz y 10h oscuridad, temperatura de 25°-27° C, humedad relativa: 90%, acceso libre a una dieta con pellets (Bedoce, Perú) y agua ad libitum. Los ratones luego de un periodo de aclimatación en el bioterio de la Facultad, fueron distribuidos aleatoriamente en jaulas, en cinco grupos de tratamiento (n=12). El día de inicio del estudio, se les administró CP (50 mgKg-1) por única vez vía intraperitoneal, excepto al grupo control negativo.

VARIABLES DE ESTUDIO

En el presente trabajo se evaluaron los pesos de órganos reproductivos, los espermogramas, análisis de la motilidad, análisis de la vitalidad, análisis de la morfología espermática, recuento espermático preciso, integridad de la membrana plasmática y la evaluación del Índice de Fragmentación de ADN espermático.

PROCEDIMIENTOS

Plantas

Frutos de "camu-camu", *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh fueron colectados en la ciudad de Pucallpa en Perú; transportados vía aérea a Lima y trasladado

inmediatamente al laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Las plantas fueron certificadas por el Departamento de Botánica de la UNMSM. En el laboratorio, el fruto fue pesado y licuado; la pulpa de los frutos de "camu-camu" fue extraído y secado a 60° C por 24 horas en una estufa de convección de aire seco.

Posteriormente, se preparó un extracto acuoso al 10% (p/v) por 24 horas a 60° C. Después de las 24 horas el extracto fue decantado, filtrado, cuantificado y guardado a -20 °C; con este extracto se preparó otro extracto acuoso final al 2% (p/v). El fruto de "camu camu" fue liofilizado y almacenado para su posterior uso. La distribución del liofilizado de "camu camu" fue resuspendido en agua destilada como vehículo, en tres dosis diferentes (10 mgKg-1, 50 mgKg-1 y 100 mgKg-1). Se administró el "camu camu" vía sonda nasogástrica de Fisher n° 18 diariamente durante 45 días.

Diseño experimental

Los ratones separados en jaulas tuvieron la siguiente distribución; un grupo control negativo CN (n=12) que se administró vía ip solución salina durante el mismo periodo de tiempo; un grupo T2 (n=12) el cual se le administró extracto de camu - camu (10 mgkg-1 de PC) por 45 días; un grupo T3 (n=12) el cual se le administró extracto de camu - camu (50 mgkg-1 de PC) por 45 días; un grupo T4 (n=12) el cual se le administró extracto de camu - camu (100 mgkg-1 de PC) por 45 días; un grupo T5 (Control positivo), el cual se le administró vía ip Sólo ciclofosfamida (50 mgKg-1 PC) por única vez. Durante el transcurso de los tratamientos se obtendrán los pesos corporales diariamente y al finalizar todos los especímenes de cada grupo fueron sometidos a dos evaluaciones. La primera es la evaluación de espermogramas y la segunda es la evaluación del Índice de Fragmentación del ADN espermático. Finalizados los tratamientos los ratones fueron eutanizados y diseccionados para separar los órganos reproductivos, aislarlos de los cuerpos grasos y colocarlos en suero fisiológico a 37° C para realizar los espermogramas respectivos acorde con los parámetros aprobados por la OMS⁽¹⁹⁾, en donde se incluye el Análisis de la motilidad, análisis de la vitalidad, análisis de la morfología espermática, recuento espermático preciso, integridad de la membrana plasmática y la evaluación del Índice de Fragmentación de ADN espermático.



Obtención de órganos reproductivos

Con ayuda del estereoscopio se separaron los siguientes órganos del sistema reproductivo masculino (del lado derecho e izquierdo): testículo, cabeza y cuerpo del epidídimo, cola del epidídimo y conducto deferente, a continuación, fueron pesados y mantenidos en suero fisiológico a 37° C durante la aplicación del protocolo para espermogramas. Se tomó la cola del epidídimo para seccionarlo en 0.5 de Buffer fosfato salino (PBS) a 37° C. para el análisis de la fragmentación del ADN espermático tal cual indica el protocolo del Kit Halomax (HALOTECH DNA SL). Se considera espermatozoides con ADN fragmentado aquellos con un halo grande y con manchas de dispersión de la cromatina y espermatozoides sin ADN fragmentado aquellos con un pequeño y compacto halo de dispersión de la cromatina.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron tabulados adecuadamente e ingresados en el software Excel 2007 para ser procesados en el paquete estadístico SPSS versión 17.0 para Windows. Los resultados serán mostrados como media \pm desviación estándar (DE) y contrastados mediante ANOVA utilizando el test de Levene (para evaluar homogeneidad de varianzas), test de Kolmogorov-Smirnov (distribución normal de los pesos y concentración espermática) y el test de Tukey y de Bonferroni para datos paramétricos (morfología, vitalidad e integridad espermática) con niveles de

significancia $p < 0.05$ y $p < 0.01$.

Aspectos éticos

El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo con las pautas éticas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y del Consejo Nacional de Investigación para el cuidado y uso de animales de laboratorio⁽²⁰⁾.

RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas en el incremento del peso corporal, peso de los testículos, epidídimos y próstata ($p > 0,05$) (Tabla I); así como, en la morfología del espermatozoide (no se incluye en las tablas), entre los grupos analizados durante el experimento. Asimismo, los resultados de la vitalidad, motilidad, integridad de la membrana y el conteo espermático, se detallan en la Tabla II.

Las diferencias citológicas entre espermatozoides fragmentados y no fragmentados se muestran en la Fig. 1 y 2. En la Fig. 1, que representa al grupo control positivo (solo ciclofosfamida, 50 mgKg⁻¹ PC) se observan halos grandes, evidencia de daño al ADN del espermatozoide de ratón en un valor superior a los de la Fig. 2, donde se ven espermatozoides del grupo 4 (solo ciclofosfamida, 50 mgkg⁻¹ de PC) + extracto de camu camu (100 mgkg⁻¹ de PC), donde se ven escasos espermatozoides con halo grande. Hay que destacar que la presencia de flagelo diferencia los espermios de otras posibles células involucradas.

Tabla 1. Peso (gr) de los órganos del aparato reproductor de ratones machos. Los datos están expresados como media \pm SD.

GRUPO	PESO TESTICULAR	PESO DEL EPIDIDIMO	PESO DE LA PROSTATA
Control negativo	0,1277 \pm 0,0025	0,0413 \pm 0,0012	0,0513 \pm 0,0022
Tratamiento 1	0,1066 \pm 0,0054	0,0401 \pm 0,0012	0,0510 \pm 0,0016
Tratamiento 2	0,1121 \pm 0,0046	0,0219 \pm 0,0239	0,0500 \pm 0,0008
Tratamiento 3	0,1123 \pm 0,0033	0,0377 \pm 0,0021	0,0459 \pm 0,0017
Control positivo	0,0899 \pm 0,0691	0,0338 \pm 0,0028	0,0428 \pm 0,0029

$p < 0,05$ Tratamientos vs control

Tabla 2. Efecto de *Myrciaria dubia* H. B. K. McVaugh “camu camu” en la motilidad (MP, MNP, IM), vitalidad, motilidad, integridad de la membrana y conteo espermático tratados con ciclofosfamida (50 mgKg⁻¹ PC). Datos en porcentaje. Tratamiento de 45 días.

Tratamiento	MP	Motilidad MNP	IM	Vitalidad (viables)	Integridad de la membrana (viables)	Conteo espermático (millones por ml)
CN	54.399±14.311	11.623±8.096	33.978±10.749	60.944±20.221	60.342±13.745	1.079x10 ⁶ ±51.563
CP	49.564±11.361	12.558±9.965	37.878±10.624	65.722±18.777	56.978±14.844	1.310x10 ⁶ ±25.797
10mgkg ⁻¹	42.121±20.103	12.476±9.508	45.403±18.788	46.401±31.631	51.555±20.636	1.059x10 ⁶ ±25.658
50mgkg ⁻¹	29.391±12.306**	14.559±7.600	56.050±14.123**	40.714±13.082	49.289±18.396	0.795x10 ⁶ ±30.568**
100mgkg ⁻¹	46.297±7.147	18.446±7.692	35.257±5.886	56.787±14.220	58.867±9.421	1.646x10 ⁶ ±29.698

CN=control negativo; CP=control positivo. MP (Motilidad progresiva rápido y Motilidad progresiva lenta) Espermatozoide moviéndose activamente en línea recta o círculos sin tomar en cuenta la velocidad. MNP (Motilidad no progresiva) Espermatozoides que muestren motilidad sin locomoción. IM (Inmotilidad) Ausencia absoluta de motilidad. Los valores son expuestos como Media ± SD
 **Significativos para p<0.05 en comparación con el control positivo



Figura 1. Resultados del Test Halomax en espermatozoides de ratón tratados con ciclofosfamida (50 mgKg⁻¹ PC). La presencia de halos grandes, evidencia daño en el ADN, signo de fragmentación 400x

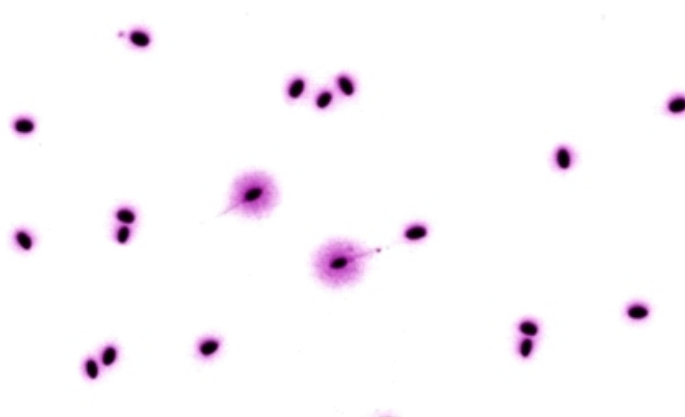


Figura 2. Resultados del Test Halomax en espermatozoides de ratón tratados con ciclofosfamida (50 mgKg⁻¹ PC) y extracto acuoso de camu camu (100mgKg⁻¹PC). La presencia de opocos espermatozoides fragmentados sugiere el efecto protector del fruto. 400x



DISCUSIÓN

La reproducción y la fertilidad son la base de la continuidad de las especies. Sin embargo, cuando nos referimos a nuestra propia especie esta premisa va más allá de simplemente cumplir nuestro fin biológico, puesto que, si bien es cierto, la infertilidad como enfermedad no ocasiona la muerte de los individuos, sí ocasiona por lo general situaciones que podrían establecerse como carentes de bienestar psicológico y social ⁽¹⁾. Visto desde esta óptica, todo esfuerzo en generar conocimientos que permitan ayudar a las personas en el objetivo de lograr la concepción deberían ser consideradas prioritarias desde el punto de vista biológico y clínico.

El efecto protector de las sustancias antioxidantes contra la genotoxicidad puede realizarse de tres maneras disminuyendo la asimilación de genotóxicos prooxidantes, previniendo su formación en la dieta misma; como agente reductor en los lugares de acción de los pro oxidante, induciendo enzimas de detoxificación capaces de reducir a los intermediarios activos de oxígeno ⁽³⁻¹⁶⁾. Al analizar el efecto protector del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* mediante el test de integridad del ADN espermático se evidenció que no existen diferencias significativas entre CN y los grupos tratamiento; estos resultados sugiere un efecto protector del extracto

acuoso del fruto del camu-camu frente al daño oxidativo de CP.

Por otra parte, se determinó que el suplemento oral con vitamina C en humanos disminuye el daño al DNA inducido por el peróxido de hidrogeno (H₂O₂). Estudios in vivo en células humanas e in vivo en roedores demostraron que altas concentraciones intracelulares de ácido ascórbico reducen las mutaciones causadas por el estrés oxidativo del KBrO₃⁽²⁰⁾; es probable que el alto contenido de Acido Ascórbico (vitamina C) presente en el fruto de "camu-camu", sea la responsable del efecto protector evidenciado en los resultados al encontrarse un número similar de células de grado 0 entre T1 y T4. Es conocido que el CP induce alteraciones permanentes a partir de diferentes tipos de daños que pueden ser detectados en un test de micronúcleo mediante el bloqueo de citocinesis ^(22,23). Estos hallazgos indicarían que el CP induce a un daño del DNA por una serie de diferentes mecanismos además del estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

Se concluye que la administración oral de extracto acuoso de "camu camu" podría contrarrestar, modular y neutralizar los efectos del CP, evidenciado esto en la disminución de la tasa de espermios con daño en el ADN nuclear en las muestras tratadas.

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.

Financiamiento: Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (proyecto con fondos monetarios, código 151001171)

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Recibido: 12 de Mayo, 2024.

Aprobado: 11 de Julio, 2024.

Correspondencia: José Luis Rafael Pino Gaviño.

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

Teléfono: 992169186

Correo electrónico: jpino@unmsm.edu.pe



REFERENCIAS

1. Roa Meggo Y. La infertilidad como problema de salud pública en el Perú. *Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia*. 2014 Feb 16;58(2):79–85. <https://doi.org/10.31403/rpgo.v58i77>
2. Lourenço ML, Moura GA de, Rocha YM, Rodrigues JPV, Monteiro PB. Impact of sperm DNA fragmentation on the clinical outcome of assisted reproduction techniques: a systematic review of the last five years. *JBRA Assisted Reproduction*. 2022; 27(2):282–291. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20220057>
3. Chowdhury A.R. Effect of pharmacological agents on male reproduction. *Advance in Contraceptive Delivery Systems*. 1987;3(4):347–52.
4. Moskovtsev SI, Willis J, White J, Mullen JBM. Sperm DNA Damage: Correlation to Severity of Semen Abnormalities. *Urology*. 2009 Oct;74(4):789–93. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.05.043>.
5. Crook TR, Souhami RL, McLean AE. Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells. *Cancer Research*. 1986;46:5029–5034.
6. Hemminki K, Kallama S. Reactions of nitrogen mustards with DNA. IARC scientific publications 1986;(78):55–70. PMID:3583398.
7. Acosta L, Núñez V, Vásquez J, Pino J, Shiga B. Dosis única de Ciclofosfamida disminuye la calidad espermática y el epitelio germinal masculino en ratones. *Revista Peruana de Biología* 2012 Nov; 19(2):193–198. <https://doi.org/10.15381/rpb.v19i2.840>
8. VIGIL P, BUSTOS-OBREGON E. Alkylating Agents and Mouse Spermatogenesis: Effects of a Single Dose of Cyclophosphamide. *Andrologia*. 2009 Apr 24;17(3):276–82. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1985.tb01002.x>
9. Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, Chu ST. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology*. 2006 May 1; 222(1-2):60–70. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.01.027>
10. Ramos S, Goessler K.F., Ruiz R.J., Ferrari O, Polito M., Salles M.J. 2012. Exercise protects rat testis from cyclophosphamide-induced damage. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 35(1):105–113. <https://doi.org/10.4025/actasciobiols.v35i1.12475>
11. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry*. 2004 Jun; 73:39–85. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>
12. Brinkworth MH, Nieschlag E. Association of cyclophosphamide-induced male-mediated fetal abnormalities with reduced paternal germ-cell apoptosis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanism of Mutagenesis*. 2000 Feb;447(2):149–54. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00189-X](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00189-X)
13. Collazos C, White P, White H, Viñas E, Alvistur E, Urquieta R, Vásquez J, Díaz C, Quiroz A, Roca A, Hegsted, M, Brandfield, R. La composición de los alimentos peruanos. *Anales De La Facultad De Medicina*. 2014 Nov 18;40(1):232–265. <https://doi.org/10.15381/anales.v40i1.10737>
14. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacobs RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1991 Dec 15; 88(24): 11003–11006. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.24.11003>
15. Niki E. Vitamin C as an antioxidant. *World Review of Nutrition and Dietetics* 1991;64:1–30. <https://doi.org/10.1159/000418567>
16. O'Donoghue J, Barber ED, Hill T, Aebi J, Fiorica L. Hydroquinone: Genotoxicity and Prevention of Genotoxicity Following Ingestion. *Food Chemical Toxicology* 1999 Sep; 37: 931–936. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00084-8](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00084-8)
17. Alvis R. Detección del efecto antimutagénico del extracto acuoso del fruto de *Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh "camu camu", utilizando la prueba in vivo de micronúcleos. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo con mención en Biología Celular y Genética. Escuela Académica Profesional de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2010; 91 pp. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/1357>
18. Alvis R, Pino J, Gonzáles J, Francia JC., Shiga B. Efecto citoprotector del camu-camu *Myrciaria dubia* en tres líneas celulares de ratón expuestas in vivo a bromato de potasio. *Revista Peruana de Biología*. 2011 May 4; 17(3):389–382. <https://doi.org/10.15381/rpb.v17i3.17>
19. OMS. <https://www.paho.org/es/noticias/4-4-2023-oms-alerta-que-cada-seis-personas-padece-infertilidad>.
20. National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* PubMed. Washington (DC): National Academy Press; 1996. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232589/>
21. Sai K, Umemura T, Takagi A, Hasegawa R, Kurokawa Y. The protective role of glutathione, cysteine and vitamin C against oxidative DNA damage induced in rat kidney by potassium bromate. *Japanese Journal of Cancer Research*. 1992 Jan; 83(1):45–51. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.1992.tb02350.x>
22. Samarth RM, Khan T, Srivas S, Mishra PK, Tiwari, RR. Evaluation of cyclophosphamide-induced genotoxicity and cytotoxicity in cultured human lymphocytes. *Journal of Radiation Research* 2018;9:28–32. https://doi.org/10.4103/jrcr.jrcr_1_18
23. Odagiri Y, Takemoto K, Fenech M. Micronucleus induction in cytokinesis-blocked mouse bone marrow cells in vitro following in vivo exposure to X-irradiation and cyclophosphamide. *Environmental Molecular Mutagenesis* 1994 Jan 1; 24(1):61–7. <https://doi.org/10.1002/em.2850240108>.