

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**

## **ESCUELA DE POSGRADO**



### **UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

### **PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS**

#### **TESIS:**

**TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO LIOFILIZADO  
DEL FRUTO DE AGUAYMANTO (*Physalis peruviana L.*) EN RATONES (*Mus  
musculus*) VARIEDAD *SWISS*, CAJAMARCA - 2019**

Para optar el Grado Académico de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**MENCIÓN: SALUD ANIMAL**

Presentada por:

Bachiller: JESSICA DEL PILAR BARRANTES NAVARRO

Asesor:

Dr. GIUSSEPE MARTÍN REYNA COTRINA

Cajamarca - Perú

2021

COPYRIGHT © 2021 by  
**JESSICA DE PILAR BARRANTES NAVARRO**  
Todos los derechos reservados

# UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

## ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

## PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

### TESIS APROBADA:

**TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO LIOFILIZADO DEL FRUTO DE AGUAYMANTO (*Physalis peruviana L.*) EN RATONES (*Mus musculus*) VARIEDAD *SWISS*, CAJAMARCA - 2019**

Para optar el Grado Académico de

**MAESTRO EN CIENCIAS**  
**MENCIÓN: SALUD ANIMAL**

Presentada por:

Bachiller: JESSICA DEL PILAR BARRANTES NAVARRO

### JURADO EVALUADOR

Dr. Giuseppe Martín Reyna Cotrina  
Asesor

Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares  
Jurado Evaluador

Dr. Juan de Dios Rojas Moncada  
Jurado Evaluador

M.Cs. Carlos Alberto Amorós Delgado  
Jurado Evaluador

Cajamarca - Perú

2021



**Universidad Nacional de Cajamarca**  
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD  
**Escuela de Posgrado**  
CAJAMARCA - PERU



**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS**  
**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS**

Siendo las dieciséis horas del día 21 de julio de dos mil veintiuno, reunidos a través de Gmeet [meet.google.com/rzx-djxx-fvm](https://meet.google.com/rzx-djxx-fvm), creado por la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, el Jurado Evaluador presidido por el **Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES**, **Dr. JUAN DE DIOS ROJAS MONCADA**, **M.Cs. CARLOS ALBERTO AMORÓS DELGADO**, y en calidad de Asesor el **Dr. GIUSSEPE MARTÍN REYNA COTRINA**. Actuando de conformidad con el Reglamento Interno de la Escuela de Posgrado y la Directiva para la Sustentación de Proyectos de Tesis, Seminarios de Tesis, Sustentación de Tesis y Actualización de Marco Teórico de los Programas de Maestría y Doctorado, se dio inicio a la Sustentación de la Tesis titulada: **TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO LIOFILIZADO DEL FRUTO DE AGUAYMANTO (*Physalis peruviana L.*) EN RATONES (*Mus musculus*) VARIEDAD SWISS, CAJAMARCA-2019**; presentada por la **Bach. en Medicina Veterinaria JESSICA DEL PILAR BARRANTES NAVARRO**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó APROBAR con la calificación de DIECIOCHO (Excelente) la mencionada Tesis; en tal virtud, la **Bach. en Medicina Veterinaria JESSICA DEL PILAR BARRANTES NAVARRO**, está apta para recibir en ceremonia especial el Diploma que la acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Ciencias Veterinarias, con Mención en **SALUD ANIMAL**.

Siendo las diecisiete horas con veinte minutos del mismo día, se dio por concluido el acto.

.....  
**Dr. Giuseppe Martín Reyna Cotrina**  
Asesor

.....  
**Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares**  
Jurado Evaluador

.....  
**Dr. Juan de Dios Rojas Moncada**  
Jurado Evaluador

.....  
**M.Cs. Carlos Alberto Amorós Delgado**  
Jurado Evaluador

## **DEDICATORIA**

A mis apreciados padres, Raúl y Victoria, a mi amado esposo Lenin y a mis queridos hermanos Raúl, Fiorela y Leonardo, por sus consejos y apoyo durante todo el desarrollo del presente trabajo, por los ánimos y por orientación que me brindaron cuando más los necesitaba.

Jessica del Pilar

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por darme la dicha de vivir y poner en mi camino grandes personas que me ayudan siempre a alcanzar las metas anheladas, y que, pese a toda complicación, me dan fuerzas para seguir adelante.

A mis padres Raúl y Victoria, por haberme incentivado con su ejemplo y dedicación a formarme en iniciar mis estudios de posgrado, y por brindarme su apoyo sin fronteras en cada etapa que se vino presentando.

A mi esposo Lenin Espinoza, por darme la fortaleza y su valioso apoyo al ciento por ciento a cada paso. Ha sido un soporte fundamental en cada proceso que se presentó durante el desarrollo de este trabajo de investigación. Desde el comienzo hasta el final me brindó y sabe brindarme ese vital calor suyo.

A mi asesor, el Dr. Giuseppe Reyna, por la orientación inicial del trabajo de investigación; pues, siempre ha estado motivándome durante la ejecución del trabajo práctico y ofreciéndome su decidido apoyo en lo referente a laboratorio, cual medio fundamental de mi trabajo.

Al profesor Julio Campos, por su asesoramiento en ámbito de laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo y por su valioso tiempo dedicado al presente trabajo realizado con la investigación.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Roberto Acosta, al Dr. César Lombardi y al Dr. Jorge Gamarra, por ser los guías y maestros, y, sobre todo, por su tiempo y trabajo dedicados en todo momento.

Jessica del Pilar

El hombre puede medir el valor de su propia alma en la mirada agradecida  
que le dirija un animal al cual ha socorrido

Platón

# CONTENIDOS

Ítem	Página
DEDICATORIA .....	v
PREFACIO .....	xiv
LISTA DE ABREVIACIONES .....	xv
RESUMEN .....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
CAPÍTULO I .....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS .....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO II .....	5
MARCO TEÓRICO .....	5
2.1. Antecedentes.....	5
2.2. Bases teóricas .....	6
2.2.1. <i>Physalis peruviana</i> L. ....	6
2.2.2. Aspectos etnobotánicos de <i>Physalis peruviana</i> L. ....	8
2.2.3. Composición química .....	9
2.2.4. Efecto tóxico .....	9
2.2.5. Efecto antioxidante.....	10
2.3. Marco Conceptual.....	12
2.3.1. Etnomedicina.....	12
2.3.2. Toxicología .....	12
2.3.3. Flavonoides.....	13
CAPÍTULO III.....	15
CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS.....	15
3.1. Hipótesis.....	15
3.2. Localización del estudio.....	15
3.3. Población, muestra y unidad de análisis.....	16
3.4. Descripción del diseño de contrastación.....	17
4.4. Materiales.....	17
4.4.1. Material biológico .....	17
4.4.2. Material de campo y de laboratorio .....	18

4.4.3. Material químico y fármacos.....	18
4.4.4. Equipos y dispositivos .....	18
4.5. Métodos .....	19
4.5.1. Tipo y diseño de estudio .....	19
4.5.2. Selección de ratones .....	19
4.5.2.1. Manejo de ratones .....	20
4.5.3. Recolección de los frutos de <i>Physalis peruviana L.</i> .....	20
4.5.4. Obtención y preparación del extracto etanólico de fruto de <i>Physalis peruviana L.</i> .....	21
4.5.4.1. Selección y procesamiento del fruto de <i>Physalis peruviana L.</i> .....	21
4.5.4.2. Obtención del extracto etanólico liofilizado .....	21
4.5.5. Administración del extracto etanólico liofilizado del fruto de <i>Physalis peruviana L.</i> .....	23
4.5.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	24
4.5.6.1. Examen físico de los ratones.....	24
4.5.6.2. Peso corporal .....	25
4.5.6.3. Análisis anatomopatológicos e histológicos .....	25
4.5.7. Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	26
RESULTADOS.....	27
4.1. Parámetros de vida.....	28
4.1.1. Estudio de toxicidad oral subcrónica .....	28
4.1.2. Ganancia de peso.....	29
4.1.3. Estadística de ganancia de peso.....	30
4.1.4. Evaluación macroscópica de los órganos <i>post mortem</i> .....	32
4.1.5. Estadística de pesos de órganos (post mortem) .....	32
4.1.6. Hallazgos histopatológicos.....	39
4.1.6.1. Grupo I 30 mg./kg. de EEL de PPL: Hembras .....	39
4.1.6.2. Grupo I 30 mg/kg de EEL de PPL: Machos.....	42
4.1.6.3. Grupo II 300 mg./kg. de EEL de PPL: hembras.....	46
4.1.6.4. Grupo II 300 mg./kg. de EEL de PPL: machos .....	48
4.1.5.5. Grupo III 500 mg./kg. de EEL de PPL: hembras .....	51
4.1.5.6. Grupo III 500 mg./kg. de EEL de PPL: machos.....	53
4.1.5.7. Grupo control 00 mg./kg. de EEL de PPL: hembras .....	56
4.1.5.8. Grupo control 00 mg/kg de EEL de PPL: Machos .....	59
DISCUSIÓN .....	62
CONCLUSIONES.....	70
RECOMENDACIONES.....	71
LISTA DE REFERENCIAS .....	72
APÉNDICE.....	80
APÉNDICE 1: Cálculo de tamaño muestral utilizando comparación de dos medias.....	80
APÉNDICE 2: Constancia de identificación taxonómica .....	81
APÉNDICE 3: Preparación y dosificación del EEL .....	82

2.1. Cantidad de liofilizado por dosis .....	82
2.2. Concentración de las diluciones .....	83
2.3. Cálculo de dosis de EEL por ratón/día/dosis .....	84
APÉNDICE 4: Ficha clínica por cada ratón .....	85
APÉNDICE 5: Evolución de los pesos .....	86
APÉNDICE 6: Registro de signos y síntomas.....	87
APÉNDICE 7: Registro de reflejos .....	88
APÉNDICE 8: Registro de aspectos y comportamiento .....	88
APÉNDICE 9: Registro de pesos de los órganos a la necropsia.....	89
APÉNDICE 10: Lesiones macroscópicas por órgano .....	89
APÉNDICE 10: Gráficos de distribución normal de ganancia de peso en ratones hembras .....	90
APÉNDICE 11: Gráficos de distribución normal de ganancia de peso en ratones machos.....	90
APÉNDICE 12: Fotos del procedimiento del trabajo .....	91

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Tablas</b>	<b>página</b>
Tabla 1. Actividades biológicas reportadas por órganos de <i>Physalis peruviana</i> L.....	9
Tabla 2. Distribución y selección de ratones por sexo, de acuerdo a la dosis administrada en mg/kg.....	20
Tabla 3. Evaluación de toxicidad oral subcrónica en ratones ( <i>Mus musculus</i> ) variedad <i>Swiss</i> durante los 90 días de administración del EEL. ....	27
Tabla 4. Mortalidad en los 90 días.....	28
Tabla 5. Pruebas multivariante , mediante Lambda de Wilks .....	30
Tabla 6. Pruebas de efectos intrasujetos mediante Greenhouse-Geisser.....	31
Tabla 7. Prueba de normalidad mediante Kolmogorov - Smirnov .....	32
Tabla 8. Estadísticos descriptivos de pesos de por órganos hígado, riñón y corazón ratones ( <i>Mus musculus</i> ) variedad <i>Swiss</i> por sexo en gramos. ....	34
Tabla 9. Prueba de normalidad mediante Shapiro-Wilk. ....	35
Tabla 10. Prueba de igualdad de varianzas mediante la prueba de Levene, según la media y los pesos en gramos de los órganos hígado, riñón y corazón de los ratones ( <i>Mus musculus</i> ) variedad <i>Swiss</i> . ....	35
Tabla 11. Prueba de efectos inter-sujetos de los pesos de los órganos en gramos de hígado, riñón y corazón de los ratones ( <i>Mus musculus</i> ) Variedades <i>Swiss</i> .....	36
Tabla 12. Comparación de dos medias, para riñón, hígado y corazón .....	37

## FIGURAS

## página

Figura 1. Fruto de <i>Physalis Peruviana L.</i> donde se muestra el fruto envuelto por el cáliz, aun cuando el fruto está completamente maduro.....	8
Figura 2. Flujograma del proceso de extracción y estabilización del extracto etanólico de aguaymanto ( <i>Physalis peruviana L.</i> ) (Romero <i>et al</i> , 2018).....	23
Figura 3. Variación de medias según peso/semana/grupo en hembra.....	29
Figura 4. Variación de medias según peso/semana/grupo en machos.....	30
Figura 5. Gráfico de medias sexo/grupo de hígado. ....	38
Figura 6. Gráfico de medias sexo/grupo de riñón.....	38
Figura 7. Gráfico de medias sexo/grupo de corazón.....	39
Figura 8. Hígado - hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E.....	39
Figura 9. Hígado – hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. C. ....	40
Figura 10. Corteza renal – hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL, (10x) H & E.....	40
Figura 11. Corteza renal – hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL, (40x) H & E.....	41
Figura 12. Médula renal - hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	41
Figura 13. Corazón – hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. ....	42
Figura 14. Hígado – macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. ....	42
Figura 15. Hígado – macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. ....	43
Figura 16. Hígado – macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. ....	43
Figura 17. Corteza renal - Macho 30 mg/kg de EEL de PPL (10x) H & E. ....	44
Figura 18. Médula renal - Macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	44
Figura 19. Corteza renal - macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	45
Figura 20. Corazón - ratón macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. ....	45
Figura 21. Hígado - ratón hembra 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E.....	46
Figura 22. Hígado - ratón hembra 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	46
Figura 23. Corteza renal - Ratón Hembra 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E.....	47
Figura 24. Ratón hembra 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E.....	47
Figura 25. Corazón – macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E.....	48
Figura 26. Hígado- macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E.....	48
Figura 27. Hígado- macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	49
Figura 28. Corteza renal - macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	49
Figura 29. Médula renal - macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	50
Figura 30. Corazón - macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. ....	50
Figura 31. Hígado - ratón hembra 500 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E.....	51
Figura 32. Hígado - ratón hembra 500mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	51
Figura 33. Médula renal - ratón hembra 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	52
Figura 34. Corteza renal - ratón hembra 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	52
Figura 35. Corazón - ratón hembra 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	53
Figura 36. Hígado corazón - ratón macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. ....	53

Figura 37. Hígado corazón - ratón Macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	54
Figura 38. Corteza renal corazón - ratón Macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	54
Figura 39. Médula renal corazón - ratón Macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	55
Figura 40. Corazón - ratón macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E.....	55
Figura 41. Hígado - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL – control (10x) H & E. ....	56
Figura 42. Hígado - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - Control (40x) H & E. ....	56
Figura 43. Corteza renal - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - Control (10x) H & E. ....	57
Figura 44. Médula renal - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - Control (40x) H & E. ....	57
Figura 45. Médula renal - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - Control (40x) H & E. ....	58
Figura 46. Corazón - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - Control (40x) H & E. ....	58
Figura 47. Triada portal - ratón macho 00 mg./kg. de EEL de PPL - Control (40x) H & E.....	59
Figura 48. Hígado - ratón macho 00mg /kg de EEL de PPL - Control (40x) H & E. ....	59
Figura 49. Corteza renal - ratón macho 00 mg./kg. de EEL de PPL - Control (40x) H & E. ....	60
Figura 50. Médula renal - ratón macho 00 mg./kg. de EEL de PPL - Control (40x) H & E.....	60
Figura 51. Corazón - ratón macho 00 mg./kg. de EEL de PPL - Control (40x) H & E.....	61
Figura 52. Distribución normal del peso de hembras mediante Q - Q. ....	90
Figura 53. Distribución normal del peso en machos mediante Q – Q.....	90
Figura 54. Colecta de fruto y planta para identificación botánica. ....	91
Figura 55. Selección y procesamiento del fruto de <i>Physalis peruviana L.</i> (aguaymanto) en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo – Perú . ....	91
Figura 56. Ratones divididos aleatoriamente en sus respectivos grupos.....	92
Figura 57. EEL de PPL en sus respectivas dosis. ....	92
Figura 58. Eutanasia y disección. ....	93
Figura 59. Administración por sonda esofágica. ....	93

## PREFACIO

Este trabajo de investigación fue desarrollado con la finalidad de incentivar a generar futuras líneas de investigación, con enfoque en la aplicación de la Etnomedicina o Medicina complementaria, en nuestra Facultad de Ciencias Veterinarias.

En el caso particular de este trabajo se empleó el fruto de la planta de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*), con el objetivo de probar la seguridad de su consumo prolongado. Para el efecto, se ha tenido como evidencia alguna literatura que muestra sus interesantes nutrientes y muchas propiedades terapéuticas como en diabetes e hipertensión. Asimismo, tiene un efecto protector sobre el riñón y el hígado. Estas cualidades le confieren a esta fruta cualidades muy prometedoras para el consumo humano. A pesar de que podemos encontrar, sin embargo, una literatura de sus bondades, carece de información de que es un fruto completamente inocuo para la salud de sus consumidores a lo largo del tiempo. Por esta razón, se llevan a efecto experimentos con modelos animales, para realizar pruebas de toxicidad. En este estudio se realizó una administración continua del extracto etanólico liofilizado del fruto de aguaymanto, a dosis de 30, 300 y 500 mg/kg en ratones *Mus musculus*, variedad *Swiss*, y se tuvo de referencia un grupo control, todos fueron formados por machos y hembras.

En el cuerpo del presente trabajo se trata de explicar paso a paso todo lo desarrollado, como cálculo de dosis y la metodología empleada, siguiendo el manual de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Del mismo modo, al final del trabajo de investigación, se sugieren algunas recomendaciones para que futuros investigadores puedan tomarlas en cuenta cuando realicen sus trabajos de la mejor manera.

## LISTA DE ABREVIACIONES

ADN	:	Ácido desoxirribonucleico
Cu	:	Cobre
DMSO	:	Dimetilsulfóxido
EEL	:	Extracto etanólico liofilizado
Fe	:	Hierro
NOAEL	:	Nivel sin efecto adverso observado
OCDE	:	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
OMS	:	Organización Mundial de la Salud
PPL	:	<i>Physalis peruviana L.</i>
REDOX	:	Reacción de oxidación-reducción
TL	:	Tiempo letal
TLM	:	Tiempo letal medio
Zn	:	Zinc

## RESUMEN

Desde épocas muy antiguas se menciona que el fruto de *Physalis peruviana L.* (PPL) tiene numerosas propiedades medicinales como analgésico, antiséptico, antioxidante, entre otros, y se lo viene usando en muchos lugares del mundo. El objetivo del presente trabajo de investigación fue el evaluar toxicidad oral subcrónica del extracto etanólico liofilizado (EEL) de PPL en ratones *Mus musculus*, variedad *Swiss*, divididos en 4 grupos de 4 machos y 4 hembras cada uno. Se les administró tres dosis diferentes de 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. EEL de PPL a los grupos 1, 2 y 3, respectivamente, y el grupo 4 fue el grupo control que recibió cloruro de sodio. Todos los grupos tuvieron administración continua del producto en mención durante 90 días. Al final del estudio se determinó que, durante los 90 días, los ratones tanto hembras como machos no presentaron signos o síntomas compatibles con intoxicación; de igual manera, no se presentó mortalidad en ratones hembras ni machos. A la luz de la evaluación macroscópica de los órganos hígado, riñón y corazón, no se evidenciaron lesiones visibles, y, a la luz de la evaluación estadística de los pesos de dichos órganos no mostraron tener diferencia significativa entre los grupos. Como resultado de la evaluación microscópica se determinó que los grupos 1 y 4 no mostraron lesiones visibles en ningún órgano mencionado. Mientras que los grupos 2 y 3 mostraron tumefacción turbia en el hígado, y en el riñón nefrosis degenerativa vacuolar del epitelio tubular renal; sin embargo, el corazón en todos los casos no mostró lesiones visibles. Se concluyó que la dosis de 30 mg./kg. del EEL de PPL muestra seguridad al consumo durante 90 días continuos; mientras que las dosis de 300 mg./kg. y 500 mg./kg. evidencian la generación de nefrotoxicidad y hepatotoxicidad.

Palabras Clave: *Physalis peruviana L.*, toxicidad oral subcrónica, *Mus musculus*

## ABSTRACT

Since very ancient times it is mentioned that the fruit of *Physalis peruviana L.* (PPL) has numerous medicinal properties such as analgesic, antiseptic, antioxidant, among others and has been used in many places around the world. The objective of the present research work was to evaluate subchronic oral toxicity of the lyophilized ethanolic extract (EEL) of PPL in *Mus musculus* swiss variety mice divided into 4 groups of 4 males and 4 females per group. 3 different doses of 30 mg/kg, 300 mg/kg and 500 mg/kg EEL of PPL were administered to groups 1, 2 and 3 respectively and group 4 was the control group that received sodium chloride, all groups had continuous administration of the product in question for 90 days. At the end of the study it was determined that during the 90 days both female and male mice did not present signs or symptoms compatible with intoxication, in the same way there was no mortality in female or male mice.

The macroscopic evaluation of the liver, kidney and heart organs showed no visible lesions and the statistical evaluation of the weights of these organs showed no significant difference between the groups. The microscopic evaluation determined that groups 1 and 4 showed no visible lesions in any organ already mentioned. While group 2 and 3 showed cloudy swelling in the liver and in the kidney vacuolar degenerative nephrosis of the renal tubular epithelium, but the heart in all cases showed no visible lesions. Concluding that the dose of 30 mg/kg of the EEL of PPL shows safety at consumption for 90 continuous days, while the doses of 300 mg/kg and 500 mg/kg show to generate nephrotoxicity and hepatotoxicity.

Keywords: *Physalis peruviana L.*, subchronic oral toxicity, *Mus musculus*

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

La etnomedicina o medicina tradicional, definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “sistemas de conocimiento médico que se desarrollaron durante generaciones en diversas sociedades antes de la era de la medicina moderna, incluidas las prácticas de salud, enfoques, conocimientos y creencias que incorporan medicamentos de origen vegetal, animal y mineral” (Bussmann *et al.*, 2010). La Organización Mundial de la Salud estimó que alrededor del 80% de la población de países emergentes utiliza regularmente la medicina tradicional, esta que juega un papel importante en el cuidado de la salud (Rey, 2015). Por este motivo, hoy en día es imprescindible la realización de evaluaciones rigurosas de las plantas medicinales, a efectos de poder determinar la seguridad y efectividad de su uso. Asimismo, se deben aprovechar los avances científicos y tecnológicos para obtener conocimientos modernos acerca del comportamiento de la naturaleza (Rey *et al.*, 2015).

*Physalis peruviana L.* (PPL) es una fruta exótica nativa de América del Sur y en la actualidad se cultiva comercialmente en varios países tropicales y subtropicales (Yıldız *et al.*, 2015), donde es utilizada como hierba medicinal para tratar diversos padecimientos de salud; lo que, a su vez, nos estimula a realizar estudios tanto *in vitro* como *in vivo* para obtener pruebas científicas (Kasali *et al.*, 2013) respecto de sus bondades medicinales, debido a sus altos niveles de antioxidantes, vitaminas, minerales y fibra (Ahmed, 2014). Sin embargo, no se sabe por qué tiempo ni qué cantidad se debe consumir el fruto de PPL para lograr los efectos benéficos deseados, sin que los consumidores sufran perjuicio

alguno; por lo que es importante establecer la seguridad de uso de las plantas medicinales mediante la ejecución de estudios o protocolos de toxicidad científica bien controlados y validados (Al-Afifi *et al.*, 2018).

El público en general –el consumidor– está muy interesado en el acceso rápido a medicamentos seguros y eficientes, para asegurar el bienestar de pacientes tanto humanos como animales. Al emplear la medicina tradicional a largo plazo, se podría esperar que estas plantas sean inocuas al consumidor o que tengan una mínima toxicidad. Por lo tanto, la evaluación de los efectos toxicológicos de cualquier extracto de planta medicinal destinado a ser utilizado en animales o humanos es crucial (Al-Afifi *et al.*, 2018). En muchos casos, la intoxicación por plantas medicinales puede confundirse con otras enfermedades; hecho que, por cierto, dificulta su detección. En la mayoría de casos no está indicada la dosis a la que una planta o subproducto de esta puede inducir a algún efecto tóxico; sobre todo porque los consumidores creen que al aumentar el consumo de un producto tendrán mayor beneficio de este; contrariamente, causa un exceso de dosis diarias tolerables del producto, con el consecuente resultado de efectos de toxicidad. (Alonso-Castro *et al.*, 2017).

La medicina veterinaria pone en práctica la etnomedicina como tentativa para la sustitución de antibióticos y otros medicamentos químicos convencionales, que suelen ser costosos y de difícil acceso a los propietarios de los animales; además, la mayoría produce efectos secundarios en el paciente (Mota *et al.*, 2011).

Sobre la base de las grandes bondades medicinales, del bajo costo y de la fácil adquisición del fruto fresco de PPL, ha surgido la idea de realizar este estudio, con el

propósito de utilizarlo como medicina preventiva de enfermedades crónico–degenerativas; pero al mismo tiempo, se debe tener en cuenta el tiempo que se puede consumir sin desarrollar algún efecto tóxico en el consumidor. A este respecto, se ha planteado que “El fruto de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*) administrado, vía oral, por tiempo prolongado a dosis de 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. en ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*, muestra buen perfil de seguridad; lo que queda evidenciado mediante el ensayo de toxicidad oral subcrónica”.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Determinar la Toxicidad oral a dosis de 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. del fruto de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) con el método experimental de toxicidad oral por administración continuada (90 días) en roedores.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar la toxicidad oral subcrónica del fruto de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) según sexo en ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*.
2. Determinar el porcentaje de mortalidad en ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss* dosificados con 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. del fruto de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.).
3. Determinar la toxicidad oral subcrónica del fruto de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) en ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*, según peso, durante las 13 semanas de estudio.
4. Determinar los cambios macroscópico e histológico del hígado y riñón de los ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes

En muchas partes del mundo, el conocimiento tradicional y la biodiversidad vienen desempeñando un papel importante en la atención médica, la cultura, la religión, la seguridad alimentaria, el medio ambiente y el desarrollo sostenible. Además, muchos medicamentos basados en plantas, ampliamente utilizados, se derivan de un conocimiento tradicional (DeFilipps y Krupnick, 2018).

PPL es una planta nativa de América Tropical; posee diferentes quimiopreventivos o compuestos quimioterapéuticos; parte de sus compuestos poseen buenas cualidades antioxidantes (Arun y Asha, 2007); así como otros, tiene actividad en el tratamiento del cáncer, la leucemia, la hepatitis, entre otros padecimientos (Wu *et al.*, 2004). Por ejemplo, la etnomedicina peruana ha venido utilizando el fruto de PPL empíricamente para tratar el cáncer y otras enfermedades, como la hepatitis, el asma, la malaria y la dermatitis; sin embargo, estos efectos medicinales no han sido científicamente comprobados (Zavala *et al.*, 2006).

Una investigación en ratas reveló que el extracto etanólico de PPL mostró actividad antihepatotóxica frente a lesiones hepáticas inducidas por tetracloruro de carbono. Además,

se encontró que el extracto carecía de toxicidad aguda visible en estos roedores (Arun y Asha, 2007). El PPL mostro tener actividad antioxidante, como efecto antihepatotóxico y actividad antiinflamatoria. Del mismo modo, demostró que es una excelente estrategia alimentaria para personas que sufren de diabetes e hipertensión (Pinto *et al.*, 2009). En Turquía, un estudio de toxicidad del PPL efectuado en ratas de ambos sexos, a dosis de 5 000 mg./kg., en la fase aguda, arrojó que no se indujeron efectos tóxicos hepáticos, renales o hematológicos; mientras que la misma dosis, en 90 días, indujo toxicidad cardíaca solo en el género masculino (Perk *et al.*, 2013).

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Cajamarca se realizó un estudio en ratones, por el cual se determinó que, tras la administración de extracto etanólico del fruto de PPL a dosis de 50 mg./kg. (Grupo 1), 300 mg./kg. (Grupo 2) y 2000 mg./kg. (Grupo 3), no se observaron signos clínicos de toxicidad, ni en las primeros minutos u horas tras la administración (Romero *et al.*, 2018).

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. *Physalis peruviana* L.**

El aguaymanto es originario de los Andes Sudamericanos. Se encuentra en estado silvestre o asilvestrado en los pisos altitudinales intermedios en zonas tropicales y subtropicales entre los 1500 y 3000 m.s.n.m. (Llumiguano, 2014). Es un cultivo herbáceo y de frutos comestibles muy sabrosos, correspondientes a una “baya jugosa, redondeada, habitualmente de color amarillo y de intenso sabor” (Moreno, 2014). La PPL pertenece a la familia *Solanaceae* y al género *Physalis*, el cual incluye más de 120 especies en el sur y norte de América (Medina, 2012).

Clasificación Científica:

- REINO : *Plantae*
- SUBREINO : *Traqueobionta* (plantas vasculares)
- DIVISIÓN : *Embriophyta*
- CLASE : *Dycotyledoneae*
- SUBCLASE : *Methachlamydeae*
- ORDEN : *Tubiflorales*
- FAMILIA : *Solanales*
- GÉNERO : *Physalis*
- ESPECIE : *peruviana*
- NOMBRE BINOMIAL : *Physalis peruviana* L. (Moreno, 2014)

En cada lugar donde es cultivada recibe diferentes nombres. En bajo Ecuador se conoce como uvilla, chuchuva en Venezuela, en India como tepareey makowi, en Portugal como groselha do Perú, en Alemania como Kapstachelbeere, en Italia como Fisalis, en Holanda como Lampion, Goldenverry en los países de lengua inglesa, aguaymanto en Perú (Puente *et al.*, 2011), y como Tomatillo en Cajamarca (Iberico, 2019), el nombre del género (*Physalis*) proviene del griego “Physa” (vejiga o ampolla) (Fischer *et al.*, 2014).

Los beneficios asociados al consumo de PPL se deben principalmente a su composición nutricional a base de componentes biológicamente activos que proporcionan beneficios para la salud y reducen el riesgo de ciertas enfermedades. Entre los principales componentes se encuentran sus altas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados,  $\beta$ -caroteno, vitaminas A, B y C y fitoesteroles, y la presencia de minerales esenciales como hierro, vitaminas E y K1 (Ahmed, 2014).

### 2.2.2. Aspectos etnobotánicos de *Physalis peruviana* L.

Este género se caracteriza por el cáliz acrescente (Figura 1), que crece junto con el fruto; lo cubre entero hasta su madurez, formando un cáliz inflado, cuya distinción del género se debe al nombre, que deriva del griego *physalis* “viejita” (Moreno, 2014).



**Figura 1.** Fruto de *Physalis Peruviana* L. donde se muestra el fruto envuelto por el cáliz, aun cuando el fruto está completamente maduro (Moreno, 2014).

Los frutos, además, se usan frescos o secos. Las hojas y el tallo combinados son utilizados como pomadas o cataplasma para el alivio de contusiones, torceduras y dislocaciones óseas. Además, las hojas y los frutos son utilizadas para tratar las afecciones digestivas, biliares, inflamación del estómago, calvicie, caspa, presión arterial alta, diabetes, entre otros (Zavala *et al*, 2006).

A las maceraciones alcohólicas de la planta entera se les atribuye las propiedades diuréticas, antilitiásicas y antipiréticas (Díaz *et al*, 2018). Popularmente es utilizado en la vista, en tratamiento de pterigios, fortificante del nervio óptico; asimismo, para disminuir los problemas de garganta, para el tratamiento de diabetes, como diurético, expectorante, para fortalecer dientes y evitar su caída, y como antiséptico y cicatrizante (Rey, 2015).

### 2.2.3. Composición química

Estudios fitoquímicos realizados sobre el género *physalis* reportan la existencia de varios compuestos activos con actividad farmacológica: flavonoides, alcaloides, triterpenos, ceramidas, fenilpropanoides, glicosidos, vitaminas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\delta$ -tocoferol, vitamina K1,  $\beta$  caroteno y calisteginas), ácidos grasos y diferentes esteroides. Obsérvese la tabla de resumen N° 1 de la composición química (Llumiguano, 2014). Mientras que al análisis cualitativo, el jugo del fruto liofilizado de PPL demostró que posee carbohidratos, proteínas, aceites fijos, alcaloides, poliurónidos, glucósidos de flavona y glucósidos cardiotónicos (Perk *et al.*, 2013).

Tabla 1. Actividades Biológicas reportadas por órganos de *Physalis peruviana L.*

Parte de la planta	Actividad reportada extracto, fracción o metabolito
Planta entera	Actividad antihepatoma/ Extracto etanólico Inducción de apoptosis en células humanas, antitumoral/ Extracto etanólico Actividad antioxidante/ Extracto etanólico
Hojas	Actividad antiinflamatoria y antioxidante/ Extracto etanólico Actividad antihepatotóxica/Extracto acuoso Apoptosis en células cancerígenas/ Extracto denominado SCEPP-5.
Partes aéreas	Actividad citotóxica contra células cancerígenas (Pulmón, mama, hígado)/ Witanólidos
Cálices	Actividad antiinflamatoria/ Fracción denominada Pp-D28-LF
Frutos	Actividad antimicrobiana/ jugo de pulpa de frutos Hipoglicemiante, antioxidante/ Fruto entero extracto hidroalcohólico Actividad antidiabética extracto Leve actividad antiinflamatoria

Fuente: (Llumiguano, 2014)

### 2.2.4. Efecto tóxico

En 2006, demuestran que los extractos etanólicos de PPL no producen citotoxicidad marcada en células no tumorales. Los altos índices de selectividad (1,38 y 5,46) sugieren que el efecto es mayor para células neoplásicas de cáncer de colon y leucemia mieloide crónica, *in vitro* (Zavala *et al.*, 2006).

En la Universidad Nacional de Colombia se realizó un estudio, en el que el extracto etanólico de PPL presentó tener una alta letalidad frente a *Artemia salina* (larva). Este resultado de letalidad está relacionado con alguna actividad biológica como es la de citotoxicidad (Medina, 2012).

Un estudio *in vitro* demostró los efectos citotóxicos e inmunomoduladores de la expresión de interleucina-6, interleucina-8 y proteína-1 quimio atrayente de monocitos (MCP-1) en células de cáncer cervical humano (HeLa) y fibroblasto murino (L929). Los resultados indicaron una relación entre el contenido total de polifenoles, la actividad antioxidante y la actividad citotóxica que dependía del disolvente utilizado (Giraldo *et al*, 2017).

En relación con los efectos citotóxicos anticancerígenos de PPL se determinó que withalonidos están distribuidos en numerosos géneros de *Solanaceae*, gozan de gran actividad biológica mediante complejos procesos en enfermedades. Lo más beneficioso es que se presenta con muy pocos efectos adversos (White *et al.*, 2016). Teniendo un efecto sobresaliente whitalonidos como phyperunolide A, 4b-hydroxywit- hanolide, withanolide E y withanolide C contra cáncer de pulmón, cáncer de mama y líneas intracelulares de cáncer de hígado (Yu-Hsuan Lan *et al.*, 2009).

### **2.2.5. Efecto antioxidante**

Los frutos de PPL contienen compuestos como withalonides, polifenoles y fitoesterole con efectos antioxidantes, antiinflamatorios y renoprotectores (Ahmed, 2014). Las frutas y verduras contienen antioxidantes naturales que están asociados con efectos terapéuticos. No se deben a un solo compuesto, sino al efecto sinérgico de varios antioxidantes, incluidos

la vitamina C, la vitamina E, los polifenoles, los carotenoides, la luteína y el licopeno, asociados con las propiedades REDOX, agentes reductores, donantes de hidrógeno y agentes de captura de radicales libres (Giraldo *et al.*, 2017). Aumentar la ingesta de estos antioxidantes naturales es una forma efectiva de reducir el riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas que limitan la calidad y expectativa de vida de la población (Díaz *et al.*, 2018).

El interés en las propiedades antioxidantes de los frutos es relativamente reciente. Algunas propiedades medicinales del fruto de PPL se asocian con la capacidad antioxidante de los polifenoles presentes en la fruta. Algunos autores han reportado valores de la capacidad antioxidante del fruto de PPL determinado en términos de actividad captadora de radicales libres DPPH (DPPH método), la concentración de fenoles totales (método de Folin-Ciocalteu) y el ensayo FRAP (Reducción férrica / Poder antioxidante) (Puente *et al.*, 2011), Entre los componentes antioxidantes de PPL se encontró al ácido ferúlico (Zhao y Moghadasian, 2008)

Los polifenoles vegetales tienen la capacidad de actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos; los flavonoides, por su amplia actividad biológica, pueden unirse a variados polímeros biológicos, como es el caso de enzimas, transportadores de hormonas y ADN, iones metálicos transitorios (como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ); asimismo, como catalizadores del transporte de electrones, y depuradores radicales libres (Martínez *et al.*, 2002).

Las actividades antioxidantes y biológicas de PPL han sido descritas en extractos de cálices, hojas, tallos y frutos. Se ha demostrado que estos extractos inhiben el crecimiento

de diferentes líneas celulares de cáncer y manifiestan efectos protectores del hígado y otras células; además, desarrollan una actividad antiinflamatoria (Giraldo *et al*, 2017).

Numerosas son las evidencias clínicas y experimentales que mencionan que el estrés oxidativo en favor de los oxidantes debería ser un importante estímulo apoptótico en los diferentes tipos de daño hepático agudo y crónico y fibrosis hepática (Othman *et al*, 2014). De este modo, las interacciones antioxidantes naturales en el organismo tienen el efecto de retardar o prevenir la aparición de fibrosis hepática (Deng *et al*, 2012). Este efecto natural es potenciado por los compuestos con actividad antioxidante; de este modo, se promueve el daño peroxidativo a los microsomas hepáticos y a los hepatocitos.

## **2.3. Marco Conceptual**

### **2.3.1. Etnomedicina**

Uso de plantas medicinales como tratamiento en diversas enfermedades. Las preparaciones de plantas medicinales se pueden formular en muchas formas, incluidos los líquidos, y se han utilizado durante muchos años alrededor de todo el mundo (Ilmie *et al*, 2015).

### **2.3.2. Toxicología**

La toxicología permite evaluar los riesgos derivados de la exposición de seres humanos, animales y el medio ambiente a productos químicos industriales, productos fitosanitarios, biocidas, medicamentos y dispositivos médicos y bienes de consumo, incluidos alimentos y cosméticos. Las recomendaciones para la protección de los trabajadores, los

consumidores y el medio ambiente derivan de investigaciones científicas y evaluaciones de las propiedades tóxicas de estas sustancias (Remy *et al*, 2015).

El resultado del estudio de toxicidad en animales es vitalmente necesario para determinar la seguridad de las plantas medicinales, si se consideran que son adecuadas para el desarrollo de productos farmacológicos. Además, para determinar la dosis adecuada para las pruebas de toxicidad a largo plazo y para determinar los órganos afectados al final del tratamiento, se logra la prueba de toxicidad (Al-Afifi *et al*, 2018).

### **2.3.3. Flavonoides**

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen a su organismo de daños producidos a la exposición de agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, etcétera (Medina y Aviña, 2014).

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas encontradas en plantas caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula, y los flavonoides son un grupo importante de polifenoles que se producen naturalmente en los alimentos consumidos diariamente en todo el mundo. Se pueden dividir en seis clases principales: flavons, flavanons, flavonils, isoflavonas, antocianinas y flavanoles. El término “flavonoide” también se utiliza para incluir un grupo de compuestos fenólicos en plantas que contribuyen a la calidad sensorial de los frutos; también comprende la astringencia y la amargura (Licodiedoff *et al.*, 2013).

Al fruto de PPL, por su contenido de flavonoides, se le utiliza como tranquilizante natural. Cura el cáncer, el asma, la sinusitis, la hepatitis, la dermatitis y la malaria; a su vez,

actúa en el aparato digestivo: estómago, colon y del intestino. Ayuda a eliminar la albúmina de los riñones, reconstituye el nervio óptico, limpia las cataratas, controla la diabetes, la artritis incipiente y alivia eficazmente las afecciones de la garganta y combate el stress (Medina y Aviña, 2014).

## **CAPÍTULO III**

### **CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS**

#### **3.1. Hipótesis**

El fruto de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*) consumido vía oral por tiempo prolongado a dosis de 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. en ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*, muestra buen perfil de seguridad, evidenciado mediante el ensayo de toxicidad oral subcrónica.

#### **3.2. Localización del estudio**

La primera parte del trabajo fue la obtención del extracto etanólico de *Physalis peruviana L.* que se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT); mientras que la dosificación de los ratones, por un período de 90 días, se realizó en el Laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias 2F – 107 de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Cajamarca presenta las siguientes características meteorológicas y demográficas<sup>1</sup>

• Superficie	:	35 417 Km <sup>2</sup> .
• Población	:	1 529 755 hab.
• Densidad	:	43,7 hab./km <sup>2</sup> .
• Altitud	:	2 536 m.s.n.m.
• Latitud de Cajamarca	:	7° 10' 03'' Sur
• Longitud de Cajamarca	:	78° 29' 35'' Oeste
• Temperatura máxima promedio *	:	22,1 °C
• Temperatura media anual*	:	14,9 °C
• Temperatura mínima promedio*	:	8,2 °C
• Precipitación pluvial anual*	:	537 mm.
• Humedad relativa media anual*	:	64,5%
• Humedad mínima promedio *	:	36,7%
• Humedad máxima promedio *	:	87,7%

#### **4.3. Población, muestra y unidad de análisis**

Población: ratones de tres meses de edad del Bioterio del Instituto Nacional de Salud

Muestra: Para delimitar el tamaño muestral de este estudio se trabajó con la fórmula estadística de Comparación de dos medias (ver Apéndice 1), en la que detalla 8 ratones por dosis, 4 hembras y 4 machos (tres grupos, de 8 ratones para las dosis de 30, 300 y 500 mg./kg., respectivamente, y 8 ratones en el grupo control). Donde se trabajó con 95% de Nivel de Confianza, 90% de Poder Estadístico. Estos ratones fueron adquiridos del Bioterio del Instituto Nacional de Salud (ubicado en Av. Defensores del Morro 2268, Chorrillos), de 25 - 30 gramos de peso y 3 meses de edad en promedio.

Unidad de Análisis: Cada ratón y sus órganos

---

<sup>1</sup> Fuente: Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (SENAMHI, 2018).

### **3.4. Descripción del diseño de contrastación**

Indicadores

Para evaluar el efecto tóxico sobre los ratones se tomó en cuenta:

- Mortalidad
- Síntomas digestivos
- Síntomas nerviosos
- Síntomas dermatológicos
- Daños en órganos
- Cambios anatomopatológicos e histológicos

Mientras que para el extracto etanólico liofilizado de *Physalis peruviana L.* se manejó de acuerdo a la dosis en mg./kg. de peso vivo, y las dosis fueron elegidas de acuerdo con la Guía de la OCDE (OCDE, 2018). En el estudio se consideró:

- 30 mg./kg.
- 300 mg./kg.
- 500 mg./kg.

#### **4.4. Materiales**

##### **4.4.1. Material biológico**

Animales de experimentación. Se emplearon 32 ratones *Mus musculus*, 16 machos y 16 hembras. Se los dividió en 4 grupos de 4 ratones hembras y 4 machos cada uno, según el modelo recomendado por la Guía de la OCDE, de 30-40 gramos de peso y 3 meses de edad en promedio.

Frutos de *Physalis peruviana L.* Se utilizaron 5 kg. de fruto maduro silvestre de *Physalis peruviana L.*, recogidos de los cultivos del Sr. Gerardo Rumay, del Caserío Tranca 1, del

Distrito de Jesús, provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca, Perú. Se recogió una planta para la identificación y clasificación taxonómica (Ver apéndice 2).

#### **4.4.2. Material de campo y de laboratorio**

- Mandil
- Guantes
- Regla
- Libro de apuntes
- Caja de conservación
- Bolsas “Open Field”
- Sonda gástrica
- Fiolas de 10 mL, 20 mL y 25 mL
- Probetas 50 mL y 100 mL

#### **4.4.3. Material químico y fármacos**

- Agua destilada
- Pote de plástico capacidad 100 g.
- Alcohol etílico 70°
- Cloruro de sodio 0,9%
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Jeringas de 1mL
- Diazepam 0,25 mg./mL.

#### **4.4.4. Equipos y dispositivos**

- Equipo Liofilizador Labconco®

- Bomba de vacío GAST MODEL N° 0211-V45M- G218C.
- Balanza analítica
- Balanza triple brazo
- Refrigeradora
- Instrumental de disección
- Cámara fotográfica digital
- Rotavapor R-300®
- Ultracongeladora Thermo Scientific™

## **4.5. Métodos**

### **4.5.1. Tipo y diseño de estudio**

El diseño de la investigación corresponde a un estudio biológico experimental que sigue un protocolo establecido de “Estudio repetido de toxicidad oral de 90 días en roedores”, de acuerdo con los reglamentos de 1998 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (Directriz de prueba de la OCDE: 408), por ser la más adecuada para probar productos de plantas medicinales (OCDE, 2018).

### **4.5.2. Selección de ratones**

Se emplearon 32 ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*, de 30 a 40 g. de peso cada uno (Tabla 2), con un promedio de tres meses de edad. Se dividieron aleatoriamente en 4 grupos conformados por 4 hembras y 4 machos, respectivamente, A los grupos 1, 2 y 3 se les administró 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg., respectivamente, del extracto etanólico del fruto de PPL, y el cuarto grupo el control (que solo recibió cloruro de sodio).

#### 4.5.2.1. Manejo de ratones

Los ratones se alojaron en un ambiente con una iluminación controlada (ciclo de luz / oscuridad de 12/12 horas), con libre acceso a agua y con alimento controlado. Se les administró el mismo alimento durante todo el período de estudio y se realizaron las prácticas siguiendo una manipulación segura para evitar el maltrato y estrés en los ratones. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.

Tabla 2. Distribución y selección de ratones por sexo, de acuerdo con la dosis administrada en mg./kg.

GRUPOS	DOSIS 1		DOSIS 2		DOSIS 3		DOSIS 4	
	30 mg./kg.		300 mg./kg.		500 mg./kg.		00 mg./kg.	
	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS	MACHOS	HEMBRAS
GRUPO 1	4	4						
GRUPO 2			4	4				
GRUPO 3					4	4		
CONTROL							4	4
TOTAL = 32	8		8		8		8	

#### 4.5.3. Recolección de los frutos de *Physalis peruviana L.*

Los frutos fueron recolectados de los cultivos del Caserío Tranca 1, del distrito de Jesús, provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca que posee las siguientes coordenadas UTM 792506.208E 9191395.591 N 17M y una altura de 3 286 m.s.n.m. La recolección los frutos fue directa y estos fueron guardados en bolsa de papel, a fin de evitar que estos exuden y fermenten. Se seleccionaron los frutos maduros (caracterizados por una tonalidad de color amarilla/anaranjada), es decir, que se encontraron en buenas condiciones. La selección consistió en revisar externamente, a fin de poder palpar si el fruto se encontraba firme y duro. De esta manera se descartaron las frutas descompuestas, enfermas o con manchas (problemas fitosanitarios), o con daño severo, ya sea de tipo mecánico, físico o por plagas. Una vez recogidos los frutos fueron colocados en contenedores con tapa para

luego ser enviados al laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo; se echaron en bolsas autosellantes (Bolsas Open Field). El propósito fue obtener el extracto etanólico liofilizado del fruto y lograr su estabilización.

#### **4.5.4. Obtención y preparación del extracto etanólico de fruto de *Physalis peruviana* L.**

##### **4.5.4.1. Selección y procesamiento del fruto de *Physalis peruviana* L.**

En el Laboratorio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNT se seleccionaron, después de ser pelados, los frutos de *Physalis peruviana* L. que estaban en buen estado, habiéndose descartado aquellos que presentaron signos de alteración, tales como o rupturas, deterioro, picaduras, oscurecimiento o flacidez.

En seguida, fueron lavados con agua corriente y luego con agua destilada, para finalmente secar la superficie con papel toalla; luego, fueron triturados mediante el empleo de un mortero de porcelana. Se diluyó en Etanol al 50% y se dejó macerar por 12 horas en el agitador orbital magnético. Después se filtró el zumo con la ayuda de un embudo de vidrio y gasa estéril, para obtener un líquido libre de residuos a la vista (semillas y cáscara).

##### **4.5.4.2. Obtención del extracto etanólico liofilizado**

###### **Liofilización**

La liofilización, conocida como deshidrocongelación o criodesecación, se realizó para deshidratar al fruto de *Physalis peruviana* L. mediante la congelación de este al reducir la presión y permitir que el agua congelada se sublime directamente de la fase sólida a gaseosa (sin pasar por estado líquido). De este modo, la sustancia liofilizada conservó su estructura molecular evitando pérdidas nutricionales y organolépticas del fruto de PPL. De este proceso se obtuvo un polvo fino y seco (Ramirez, 2006).

## Etapas de la Liofilización (Figura 2)

- Fase 1: Etapa conductiva. Se calentó la muestra; la velocidad de sublimación creció rápidamente hasta llegar a un máximo. El tiempo para agotar esta fase es relativamente corto; en ella se llevó a cabo la mayor parte de remoción de agua del producto (entre 75-90%), siendo el mecanismo preponderante la transferencia de calor por conducción. El precongelamiento se realizó a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 horas, y el congelamiento a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 horas.
- Fase 2: Primera etapa difusiva. Hubo un descenso importante de la velocidad de sublimación debido a la formación de una capa porosa de material seco que opuso resistencia creciente al flujo de calor y al vapor a medida que avanzaba el secado. Se elevó la temperatura a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 horas.
- Fase 3: Segunda etapa difusiva. La velocidad de sublimación continuó decreciendo de forma que se aproximó a cero. Esto debido a que el calor necesario para retirar el agua ligada es más alto que el calor de sublimación, se elevó la temperatura de  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Ramirez, 2006).

## **Maceración**

Maceración. Con la muestra particulada, luego de la separación del sumo, se preparó un macerado con etanol de  $70^{\circ}$ ; cada 5 g. de muestra se mezcló con 100 mL. de alcohol, y se lo agitó verticalmente. Luego se evaporó el solvente y se obtuvo el extracto etanólico.

Estabilización. El extracto etanólico se ultracongeló en recipientes con tapa hasta su utilización.



**Figura 2.** Flujograma del proceso de extracción y estabilización del extracto etanólico de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*) (Romero *et al*, 2018)

#### 4.5.5. Administración del extracto etanólico liofilizado del fruto de *Physalis peruviana L.*

De acuerdo con los reglamentos de 1998 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (Directriz de prueba de la OCDE: 408), se dosificó diariamente a los ratones con previo ayuno sólido de 3-4 horas. Se realizó el pesado semanal de cada ratón para evaluar los cambios de peso entre semana y semana, con respecto a los 3 tratamientos y con esa medida de peso se calcularon las dosis individuales por ratón y por grupo. Cada semana se ajustó por la ganancia de peso y se preparó la cantidad necesaria del EEL de 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. fueron diluidas en cloruro de sodio y se

vertieron en pomos de color ámbar; posteriormente, se refrigeraron hasta cada uso (ver Apéndice 3).

Las dosis del EEL de PPL fueron diluidas en cloruro de sodio (ver Apéndice 1). Fue administrada por sonda gástrica, a las 6 a.m., 24 horas después de la anterior dosis, por un período de 90 días consecutivos. Al primer grupo se administró el EEL en una dosis de 30 mg./kg., al segundo 300 mg./kg., al tercero 500 mg./kg. (sin sobrepasar los 2 mL. por g. de peso corporal), y al grupo control solo se le administró el vehículo (cloruro de sodio 2 mL./100 g. de peso corporal), según indica la Guía de la OCDE. Después de 2 horas de administrado el extracto del fruto, se alimentaron a los ratones

#### **4.5.6. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

##### **4.5.6.1. Examen físico de los ratones**

Los ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss* fueron observados diariamente durante 90 días, es decir, todo el período de estudio de toxicidad subcrónica. Tras la administración de la dosis, se observaron a los animales uno tras otro, al menos una vez durante los primeros 30 minutos, y, periódicamente, durante las primeras 24 horas. Se prestó especial atención durante las primeras 4 horas.

Todas las observaciones fueron registradas sistemáticamente en fichas de cada animal (Apéndice 4). Para el caso de los signos y síntomas se evaluó: alopecia, ataxia, apnea, catalepsia, convulsiones, coma, disnea, diarrea, edema de patas, epistaxis, lacrimación, lesiones en la piel, nódulos o abscesos, piloerección, ptosis palpebral, salivación, sangrado ocular, sueño, taquipnea y temblores. Los reflejos: reflejo al dolor, corneal, de agarre, enderezamiento y de escape. Los aspectos y comportamientos: aspecto general, de la cola,

de los ojos, de genitales, de las heces, de la orina y características de la marcha (ver Apéndice 5, 6,7 y 8).

#### **4.5.6.2. Peso corporal**

Cada ratón fue pesado una vez por semana (domingos). Se controló el consumo de alimentos (ver Apéndice 5). Este proceso fue necesario para medir la ganancia de peso y verificar las variaciones por grupo, debido a que la ganancia de peso fue considerada como un efecto directo de la intoxicación.

#### **4.5.6.3. Análisis anatomopatológicos e histológicos**

Al finalizar los 90 días, todos los ratones fueron sometidos a eutanasia a través del método de sedación con halotano y seguido de exanguinación de la vena superficial temporal y punción intracardiaca (INS, 2008). En cada uno se realizó un examen minucioso de los órganos vitales: riñones, hígado, pulmones y corazón, los cuales fueron cuidadosamente extraídos, lavados, secados con papel tisú y pesados. Riñones e hígados fueron adecuadamente conservados en formol bufferado al 10%, durante 24 h. Luego se procedió a tallar los órganos en los soportes de plástico. Posteriormente, estos soportes pasaron a parafina para formar los tacos, y se procesaron de forma rutinaria para microscopía óptica. Se obtuvieron rodajas de 4-5  $\mu\text{m}$  de los bloques preparados y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Las preparaciones obtenidas se visualizaron mediante microscopía con aumentos de 10 y 40x, para identificar alteraciones patológicas no visibles macroscópicamente (ver Apéndice 8 y 9). Los cuerpos inertes fueron enterrados en la fosa de Patología Veterinaria que se encuentra en el Hospital Veterinario, a una profundidad de 45 -50 cm. y fueron cubiertos con cal y tierra.

#### **4.5.7. Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

Los resultados obtenidos fueron procesados empleando el programa SPSS, versión 22. Consecuentemente, se reportaron tablas con estadísticas resumen para cada grupo: La toxicidad oral subcrónica del extracto etanólico de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*) en ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss* fue analizada empleando Kolmogorov – Smirnova para la normalidad y ANOVA (nos sirve para comparar varios grupos en una variable cuantitativa) con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

En el presente estudio, los resultados muestran que al finalizar los 90 días de administración diaria con el extracto etanólico liofilizado de *Physalis peruviana L.* (aguaymanto) con una dosis de 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. a los grupos 1, 2 y 3, respectivamente, y cloruro de sodio al grupo control, no se evidenciaron signos de toxicidad, ni mortalidad, la relación tiempo, sexo y dosis en los ratones con una significancia de 0,13 ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.** Evaluación de toxicidad oral subcrónica en ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss* durante los 90 días de administración del EEL.

POBLACIÓN		N	TOXICIDAD	MORTALIDAD	%	MEDIA PESO	TIEMPO/SEXO/DOSIS
<b>GRUPO 1</b>	HEMBRAS	4	NO	0	0	35,55 g	sig. = 0,13
	MACHOS	4	NO	0	0	38,74 g	
<b>GRUPO 2</b>	HEMBRAS	4	NO	0	0	32,66 g	
	MACHOS	4	NO	0	0	38,07 g	
<b>GRUPO 3</b>	HEMBRAS	4	NO	0	0	37,30 g	
	MACHOS	4	NO	0	0	37,51 g	
<b>GRUPO CONTROL</b>	HEMBRAS	4	NO	0	0	35,27 g	
	MACHOS	4	NO	0	0	35,64 g	
<b>TOTAL</b>		32					

#### 4.1. Parámetros de vida

##### 4.1.1. Estudio de toxicidad oral subcrónica

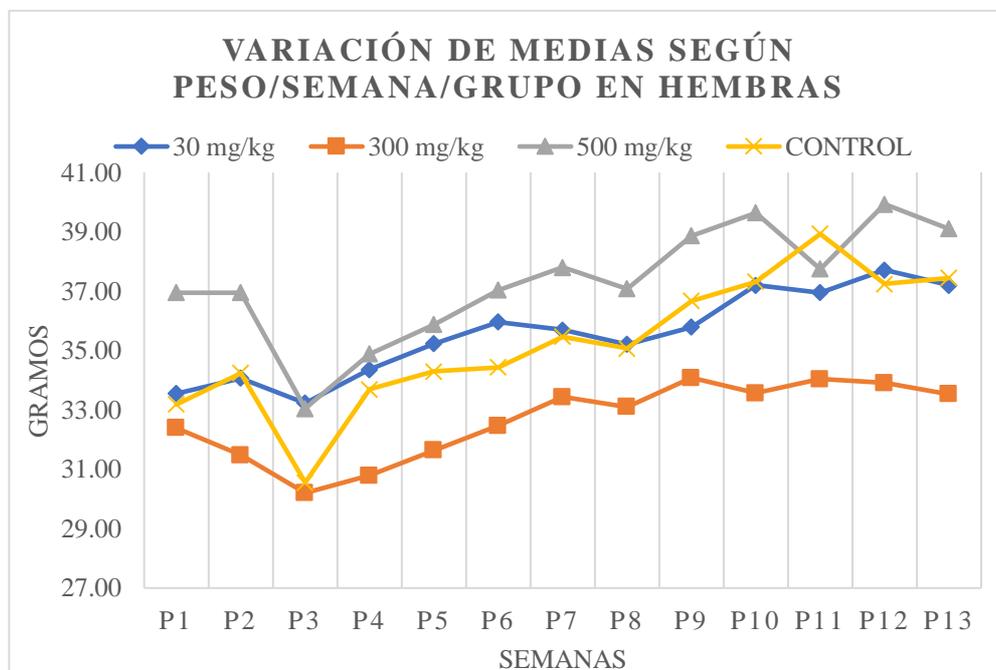
No se observó muerte en los 90 días después de la administración oral de EEL de PPL en dosis de 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. a ratones hembras y machos (ver Tabla 3); no se evidenciaron síntomas de comportamiento anormal como sedación, somnolencia, convulsiones, pérdida de reflejo al dolor o al escape, ni síntomas neurológicos como temblor, parálisis o convulsiones; tampoco hubo cianosis, asfixia, salivación ni diarrea durante las 24 horas y durante los 90 días de observación.

**Tabla 4.** Mortalidad en los 90 días

RATONES	Casos			
	Válido		Perdidos	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje
HEMBRAS G 1	4	100,0%	0	0,0%
MACHOS G 1	4	100,0%	0	0,0%
HEMBRAS G 2	4	100,0%	0	0,0%
MACHOS G 2	4	100,0%	0	0,0%
HEMBRAS G 3	4	100,0%	0	0,0%
MACHOS G 3	4	100,0%	0	0,0%
HEMBRAS CONTROL	4	100,0%	0	0,0%
MACHOS CONTROL	4	100,0%	0	0,0%

#### 4.1.2. Ganancia de peso

La ganancia de peso fue constante durante el período de las 13 semanas. Se mostró un declive del peso en la tercera semana. Se puede observar en la Figura 3 las medias de ganancia de peso en las hembras, y en la Figura 4 la ganancia de peso en los machos. Se evidencia, de esta manera, que gráficamente se puede apreciar que el grupo de 500 mg./kg. de EEL tiene la mayor ganancia de peso en hembras y el grupo de 300 mg. en los machos; sin embargo, esta diferencia no es significativa; así se detalla más adelante.



**Figura 3.** Variación de medias según peso/semana/grupo en hembra.

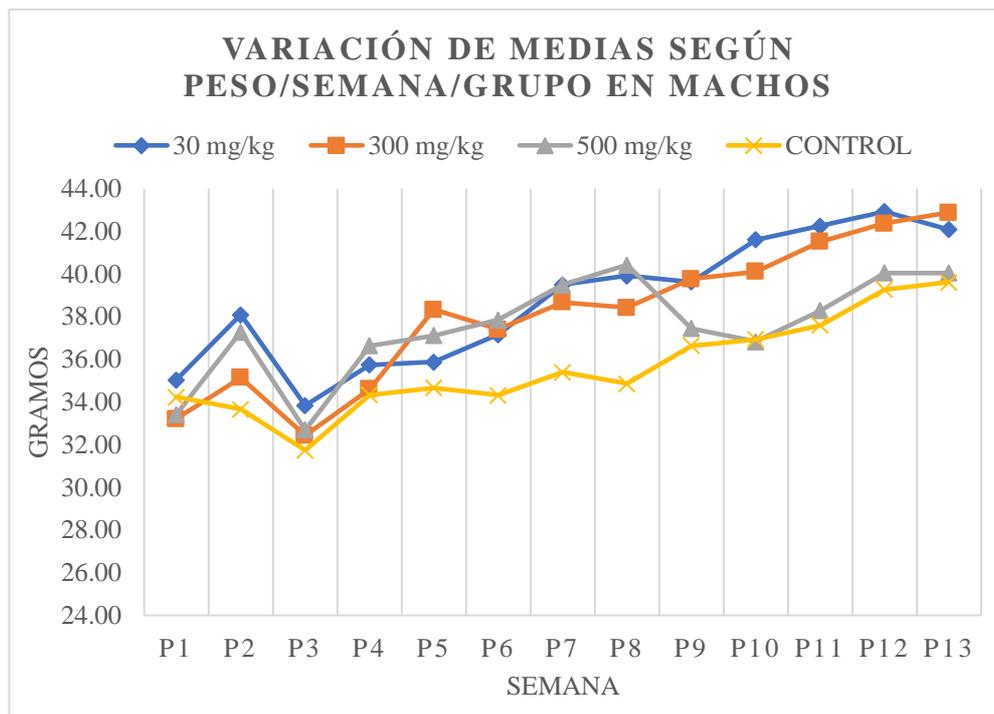


Figura 4. Variación de medias según peso/semana/grupo en machos.

#### 4.1.3. Estadística de ganancia de peso

Basándonos en los datos de pesos diarios durante los 90 días, se evaluó el cambio del peso con relación al tiempo, sexo y dosificación mediante la prueba Multivariante (Tabla 5); donde se determinó que no hay una relación significativamente estadística, ya que al evaluar todas las variables la significancia es de 0,11 ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 5.** Pruebas multivariante<sup>a</sup>, mediante Lambda de Wilks

Efecto	Valor	F	gl de hipótesis	gl de error	Sig.	
TIEMPO	Lambda de Wilks	0,02	51,067 <sup>b</sup>	13,00	12,00	0,00
TIEMPO * DOSIFICACIÓN	Lambda de Wilks	0,08	1,21	39,00	36,28	0,28
TIEMPO * SEXO	Lambda de Wilks	0,11	7,616 <sup>b</sup>	13,00	12,00	0,00
TIEMPO * DOSIFICACIÓN * SEXO	Lambda de Wilks	0,06	1,50	39,00	36,28	0,11

**a. Diseño : Intersección + DOSIFICACIÓN + SEXO + DOSIFICACIÓN \* SEXO**  
**Diseño intra-sujetos: TIEMPO**

**b. Estadístico exacto**

**c. El estadístico es un límite superior en F que genera un límite inferior en el nivel de significación.**

También se realizaron las pruebas de efectos intrasujetos mediante Greenhouse-Geisser (ver Tabla 6). El valor hallado en significancia con relación al peso/tiempo/dosificación/sexo fue de 0,13, cifra mayor a 0,05. También podemos observar la relación independiente de cada variable, donde se obtuvo que, con respecto al peso/tiempo, el valor es 0,00; con lo que se demostró que es altamente significativo; mientras que el peso/tiempo/dosificación obtuvo que no es significativo 0,74 ( $p > 0,05$ ); de acuerdo con el peso/tiempo/sexo, si es significativo (0,00). De otra parte, al evaluar los tres factores de manera simultánea, el valor es de 0,13 ( $p > 0,05$ ). Con ello se comprueba que no es estadísticamente significativa la ganancia de peso de los 32 ratones en los 90 días con respecto al tiempo, dosificación y sexo.

**Tabla 6.** Pruebas de efectos intrasujetos mediante Greenhouse-Geisser.

Medida: PESOMEDIDOS					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
TIEMPO	3816,58	5,53	690,17	75,79	0,00
TIEMPO * DOSIFICACIÓN	113,86	16,59	6,86	0,75	0,74
TIEMPO * SEXO	523,92	5,53	94,74	10,40	0,00
TIEMPO * DOSIFICACIÓN * SEXO	216,34	16,59	13,04	1,43	0,13
Error (TIEMPO)	1208,52	132,72	9,11		

Para realizar ANOVA, se corroboró que la variable peso posea distribución normal, y se utilizó el método de Kolmogorov – Smirnov (Tabla 7) y todos los valores cumplen al ser mayores que 0,05, representada gráficamente la distribución normal en hembras (Apéndice 10) y machos (Apéndice 11).

**Tabla 7.** Prueba de normalidad mediante Kolmogorov - Smirnov

Pruebas de normalidad			
	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>		
	Estadístico	gl	Sig.
<b>PESO DE HEMBRAS GRUPO 01</b>	0,114	56	0,066
<b>PESO DE MACHOS GRUPO 01</b>	0,115	56	0,064
<b>PESO DE HEMBRAS GRUPO 02</b>	0,109	56	0,093
<b>PESO DE MACHOS GRUPO 02</b>	0,076	56	,200*
<b>PESO DE HEMBRAS GRUPO 03</b>	0,086	56	,200*
<b>PESO DE MACHOS GRUPO 03</b>	0,103	56	,200*
<b>PESO DE HEMBRAS CONTOL</b>	0,085	56	,200*
<b>PESO DE MACHOS CONTOL</b>	0,114	56	0,066

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

#### 4.1.4. Evaluación macroscópica de los órganos *post mortem*

Después de que los ratones fueron exanguinados, se los sometió a necropsia para retirar el hígado, riñón y se creyó necesario evaluar los corazones de todos los ratones. Al examinar macroscópicamente los órganos, no se hallaron focos hemorrágicos o necróticos.

#### 4.1.5. Estadística de pesos de órganos (post mortem)

Los pesos de los órganos hígado, riñón y corazón de los ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss* fueron analizados en relación con el sexo y cada grupo de dosificación mediante la tabla de estadísticos descriptivos (Tabla 8); lo que nos muestra el resumen de los datos basados en la media de los pesos de cada órgano y su respectiva desviación estándar. Posteriormente, para poder realizar ANOVA se realizó la prueba de normalidad

mediante Shapiro-Wilk (Tabla 9), en la que todos los valores fueron mayores que 0,05; lo cual nos indica que los datos sí cumplen con tener una distribución normal. Al realizar la prueba de igualdad de varianzas mediante el estadístico de Levene (Tabla 10), nos indica que en Hígado y corazón podemos suponer que son varianzas iguales estadísticamente, debido a que en ambos casos la significancia es mayor que 0,05; donde, en hígado es de 0,061 y en corazón de 0,060; sin embargo, en riñón se supone que es una varianza distinta, estadísticamente, debido a que su significancia es 0,043, menor que 0,05. Para evaluar la interacción entre sexo, grupo y peso de órgano se realizó la prueba de Efectos Inter – sujeto (Tabla 11); para ello, se usó las medias de los pesos de los órganos, y, como resultado, se tuvo que, al analizar los órganos uno a uno, el riñón muestra ser significativo ( $p < 0,05$ ); pero, al evaluar los tres factores no hay interacción estadísticamente significativa, ya que los valores son mayores que 0,05, donde, la significancia para hígado, riñón y corazón fue de 0,435, 0,148 y 0,442, respectivamente.

Con el fin de analizar los grupos de tratamiento con los pesos de los órganos se realizó la comparación de medias mediante Tukey (Tabla 12), donde se muestra que, en riñón, las medias en todos los grupos no presentan variación, ya que su significancia es 0,104; en el hígado tampoco hay variación entre las medias de los grupos, debido a que su significancia es 0,316, y, de igual modo, para el corazón con una significancia de 0,160. Se concluye que no existen variaciones estadísticamente significativas en riñón, hígado y corazón ( $p > 0,05$ ). Finalmente, se muestran los gráficos de los pesos de hígado, riñón y corazón (Figuras 5, 6 y 7).

**Tabla 8.** Estadísticos descriptivos de pesos en gramos por órganos, hígado, riñón y corazón de ratones (*Mus musculus*) Variedad *Swiss* por sexo.

Estadísticos descriptivos					
SEXO			N	Media	Desv. Desviación
<b>MACHO</b>	GRUPO 1	PESO DE HIGADO	4	1,97	0,12
		PESO DE RIÑON	4	0,61	0,10
		PESO DE CORAZON	4	0,31	0,01
		N válido (por lista)	4		
	GRUPO 2	PESO DE HIGADO	4	2,06	0,16
		PESO DE RIÑON	4	0,54	0,07
		PESO DE CORAZON	4	0,21	0,04
		N válido (por lista)	4		
	GRUPO 3	PESO DE HIGADO	4	2,04	0,30
		PESO DE RIÑON	4	0,61	0,15
		PESO DE CORAZON	4	0,31	0,07
		N válido (por lista)	4		
	GRUPO CONTROL	PESO DE HIGADO	4	2,33	0,36
		PESO DE RIÑON	4	0,70	0,09
		PESO DE CORAZON	4	0,27	0,07
		N válido (por lista)	4		
<b>HEMBRA</b>	GRUPO 1	PESO DE HIGADO	4	1,84	0,14
		PESO DE RIÑON	4	0,58	0,10
		PESO DE CORAZON	4	0,27	0,06
		N válido (por lista)	4		
	GRUPO 2	PESO DE HIGADO	4	1,94	0,28
		PESO DE RIÑON	4	0,44	0,05
		PESO DE CORAZON	4	0,25	0,07
		N válido (por lista)	4		
	GRUPO 3	PESO DE HIGADO	4	1,88	0,15
		PESO DE RIÑON	4	0,40	0,03
		PESO DE CORAZON	4	0,32	0,17
		N válido (por lista)	4		
	GRUPO CONTROL	PESO DE HIGADO	4	1,88	0,21
		PESO DE RIÑON	4	0,49	0,06
		PESO DE CORAZON	4	0,18	0,06
		N válido (por lista)	4		

**Tabla 9.** Prueba de normalidad mediante Shapiro-Wilk.

SEXO		Pruebas de normalidad			
		Shapiro-Wilk			
		Estadístico	gl	Sig.	
<b>MACHO</b>	PESO DE HIGADO	GRUPO 1	0,785	4	0,079
		GRUPO 2	0,964	4	0,801
		GRUPO 3	0,930	4	0,593
		CONTROL	0,971	4	0,845
	PESO DE RIÑON	GRUPO 1	0,978	4	0,890
		GRUPO 2	0,966	4	0,815
		GRUPO 3	0,888	4	0,372
		CONTROL	0,927	4	0,577
	PESO DE CORAZON	GRUPO 1	0,744	4	0,161
		GRUPO 2	0,971	4	0,850
		GRUPO 3	0,913	4	0,498
		CONTROL	0,961	4	0,783
<b>HEMBRA</b>	PESO DE HIGADO	GRUPO 1	0,853	4	0,235
		GRUPO 2	0,947	4	0,697
		GRUPO 3	0,916	4	0,514
		CONTROL	0,853	4	0,236
	PESO DE RIÑON	GRUPO 1	0,813	4	0,127
		GRUPO 2	0,993	4	0,971
		GRUPO 3	0,953	4	0,734
		CONTROL	0,772	4	0,061
	PESO DE CORAZON	GRUPO 1	0,880	4	0,338
		GRUPO 2	0,925	4	0,564
		GRUPO 3	0,782	4	0,074
		CONTROL	0,973	4	0,858

**a. Corrección de significación de Lilliefors**

**significancia mayor que 0,05 se considera distribución normal**

**Tabla 10.** Prueba de igualdad de varianzas mediante la prueba de Levene, según la media y los pesos en gramos de los órganos hígado, riñón y corazón de los ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*.

		Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error <sup>a</sup>			
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<b>PESO DE HIGADO</b>	Se basa en la media	2,296	7	24	0,061
<b>PESO DE RIÑON</b>	Se basa en la media	2,522	7	24	0,043
<b>PESO DE CORAZON</b>	Se basa en la media	2,307	7	24	0,060

**Prueba la hipótesis nula de que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.**

**a. Diseño: Intersección + SEXO + GRUPO + SEXO \* GRUPO**

**Tabla 11.** Prueba de efectos intersujetos de los pesos de los órganos en gramos de hígado, riñón y corazón de los ratones (*Mus musculus*) Variedad Swiss.

Pruebas de efectos inter-sujetos							
Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta al cuadrado parcial
<b>Modelo corregido</b>	PESO DE HIGADO	,693 <sup>a</sup>	7	,099	1,873	,119	,353
	PESO DE RIÑÓN	,274 <sup>b</sup>	7	,039	4,985	,001	,592
	PESO DE CORAZON	,066 <sup>c</sup>	7	,009	1,490	,218	,303
<b>Intersección</b>	PESO DE HIGADO	127,241	1	127,241	2407,637	,000	,990
	PESO DE RIÑÓN	9,538	1	9,538	1216,424	,000	,981
	PESO DE CORAZON	2,221	1	2,221	351,864	,000	,936
<b>GRUPO</b>	PESO DE HIGADO	,176	3	,059	1,107	,365	,122
	PESO DE RIÑÓN	,078	3	,026	3,308	,037	,293
	PESO DE CORAZON	,045	3	,015	2,369	,096	,228
<b>SEXO</b>	PESO DE HIGADO	,368	1	,368	6,957	,014	,225
	PESO DE RIÑÓN	,150	1	,150	19,116	,000	,443
	PESO DE CORAZON	,003	1	,003	,539	,470	,022
<b>GRUPO * SEXO</b>	PESO DE HIGADO	,150	3	,050	,943	,435	,105
	PESO DE RIÑÓN	,046	3	,015	1,952	,148	,196
	PESO DE CORAZON	,018	3	,006	,929	,442	,104

**Tabla 12.** Comparación de dos medias, para riñón, hígado y corazón

PESO DE HÍGADO		
HSD Tukey <sup>a,b</sup>		
GRUPO	N	Subconjunto
		1
GRUPO 1	8	1,9050
GRUPO 3	8	1,9613
GRUPO 2	8	2,0025
CONTROL	8	2,1075
Sig.		0,316
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = ,053.		
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 8,000.		
b. Alfa = ,05.		
PESO DE RIÑÓN		
HSD Tukey <sup>a,b</sup>		
GRUPO	N	Subconjunto
		1
GRUPO 2	8	0,4900
GRUPO 3	8	0,5038
GRUPO 1	8	0,5938
CONTROL	8	0,5963
Sig.		0,104
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = ,008.		
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 8,000.		
b. Alfa = ,05.		
PESO DE CORAZÓN		
HSD Tukey <sup>a,b</sup>		
GRUPO	N	Subconjunto
		1
CONTROL	8	0,2250
GRUPO 2	8	0,2288
GRUPO 1	8	0,2888
GRUPO 3	8	0,3113
Sig.		0,160
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos. Se basa en las medias observadas. El término de error es la media cuadrática (Error) = ,006.		
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 8,000.		
b. Alfa = ,05.		

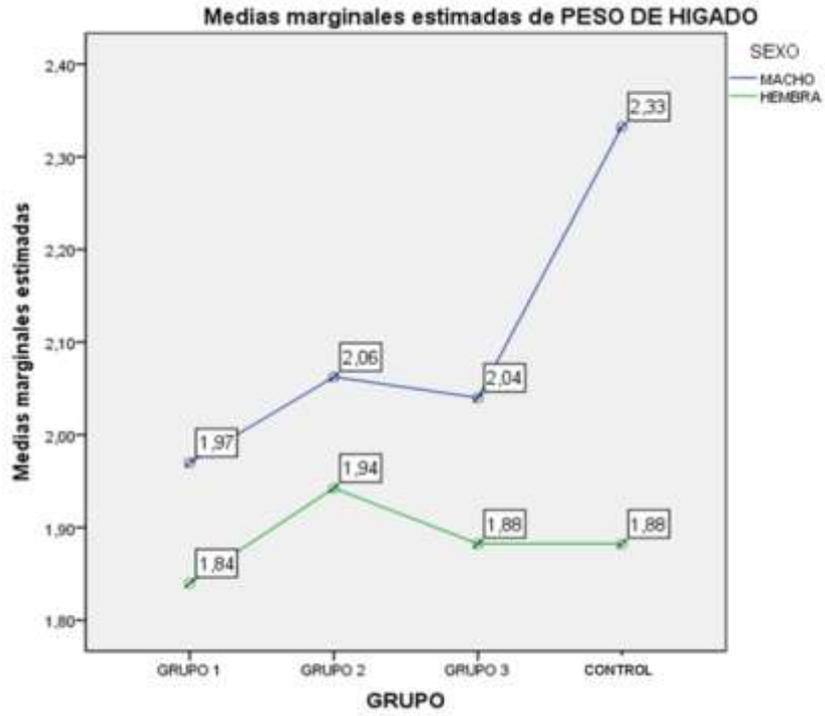


Figura 5. Gráfico de medias sexo/grupo de hígado.

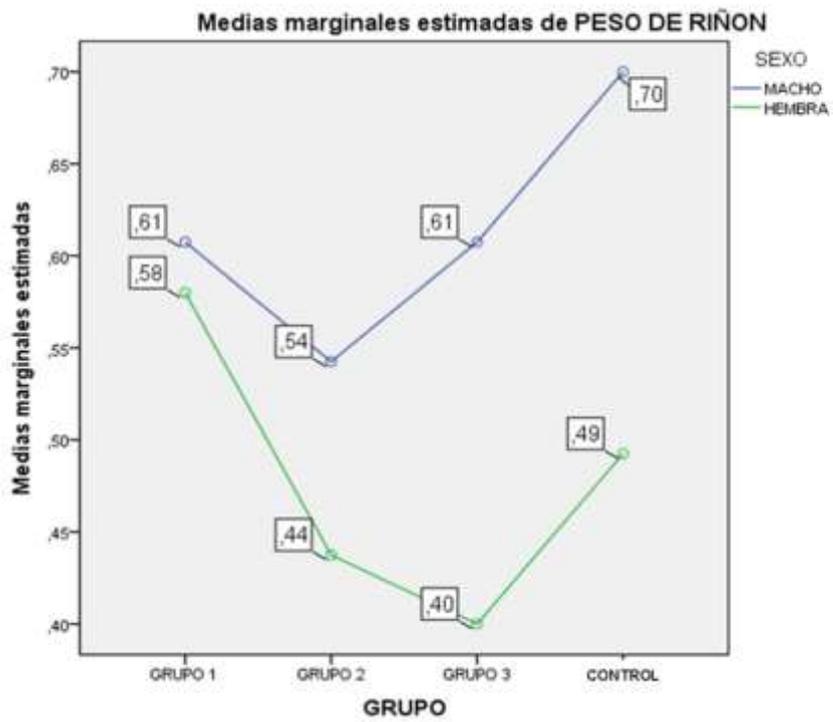
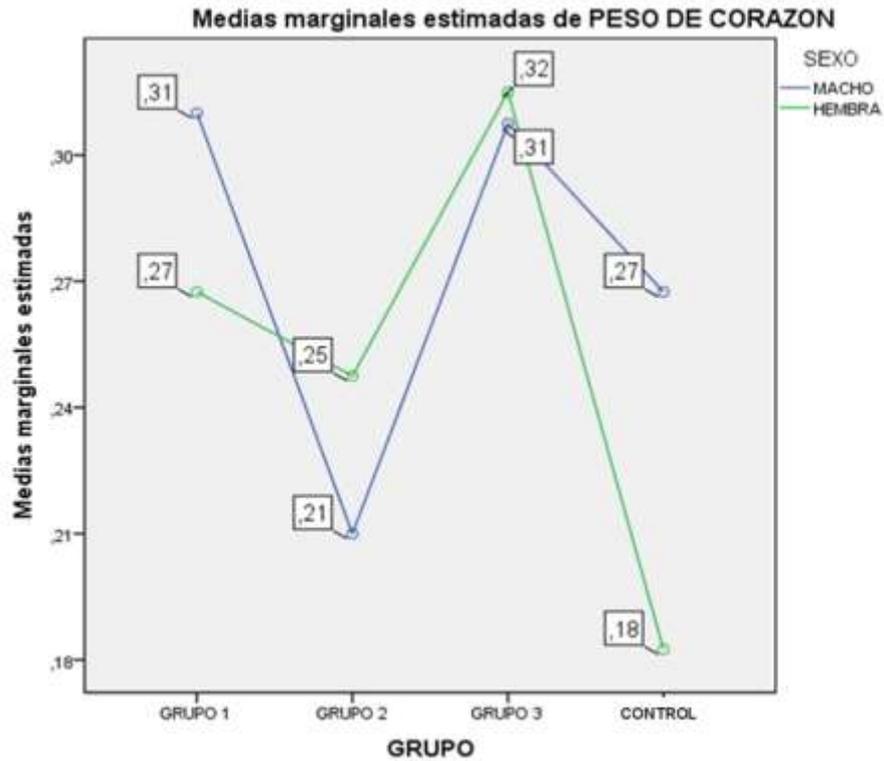


Figura 6. Gráfico de medias sexo/grupo de riñón.

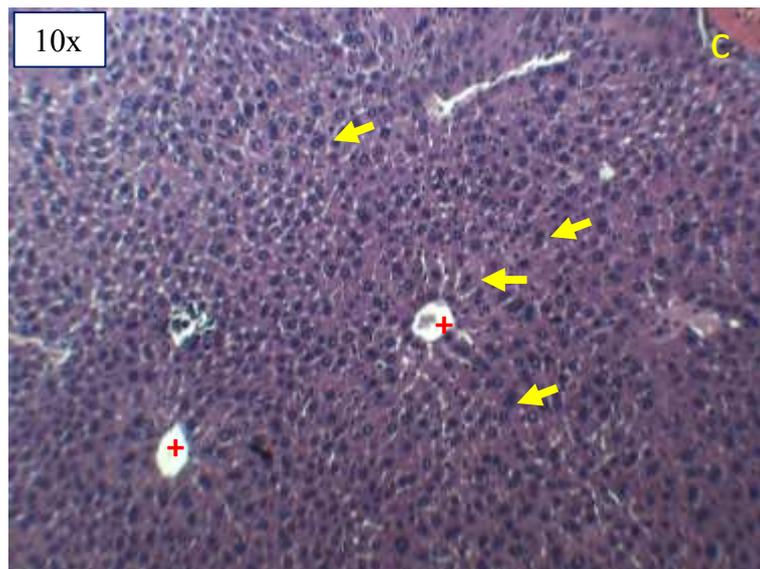


**Figura 7.** Gráfico de medias sexo/grupo de corazón.

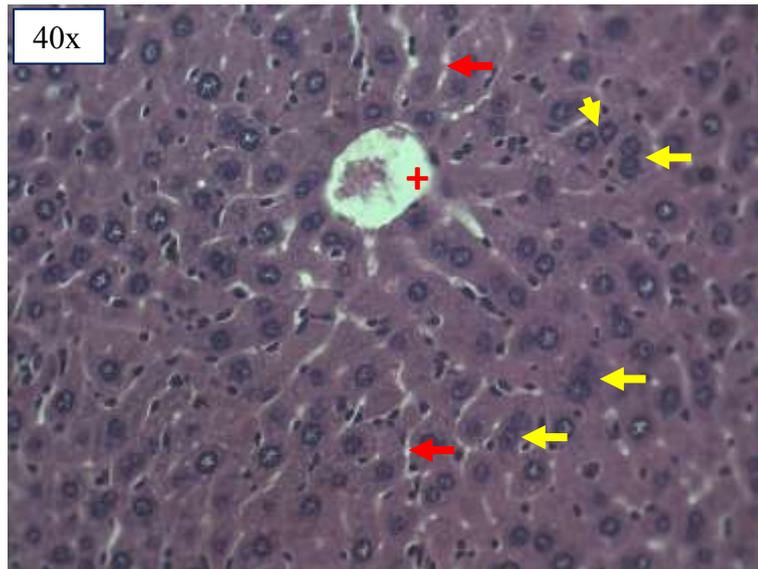
#### 4.1.6. Hallazgos histopatológicos

##### 4.1.6.1. Grupo I 30 mg./kg. de EEL de PPL: Hembras

\* Hígado:

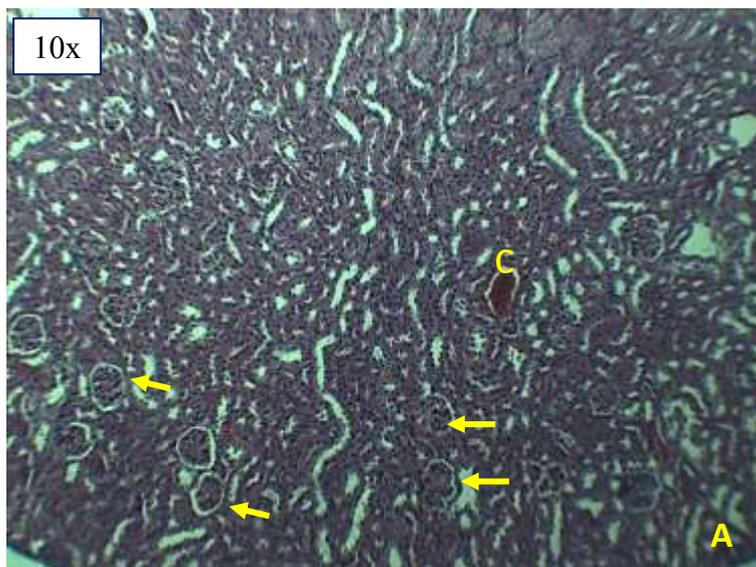


**Figura 8.** Hígado - hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. Se muestra congestión en vasos sanguíneos, venas centrales dilatadas y varios hepatocitos binucleados. Diagnóstico: moderada congestión y dilatación vascular. + Vena centrolobulillar, C congestión vascular y dilatación y **flecha amarilla:** hepatocitos binucleados.

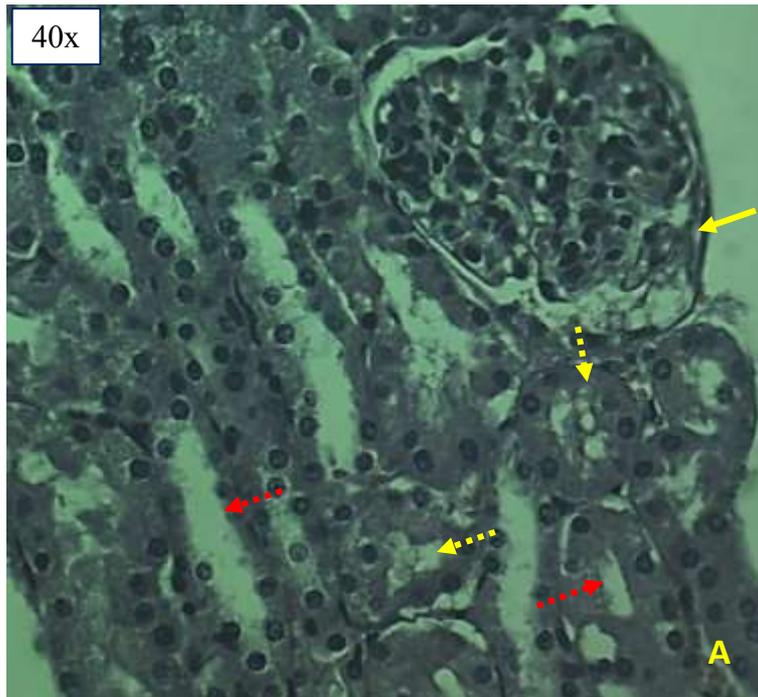


**Figura 9.** Hígado – hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Cordones hepáticos con conservada arquitectura, vena central dilatada y congestionada Diagnóstico: Moderada congestión y dilatación vascular. **Flechas rojas:** sinusoides hepáticas y **flecha amarilla:** hepatocitos binucleados.

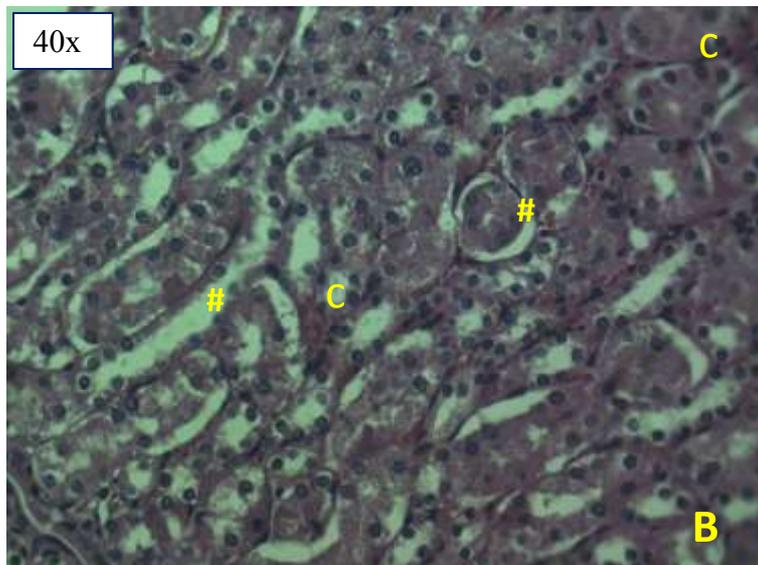
\* **Riñón**



**Figura 10.** Corteza renal – hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL, (10x) H & E. Diagnóstico: moderada dilatación y congestión vascular. **C:** congestión vascular, **A:** corteza renal y **flecha amarilla:** corpúsculo renal.

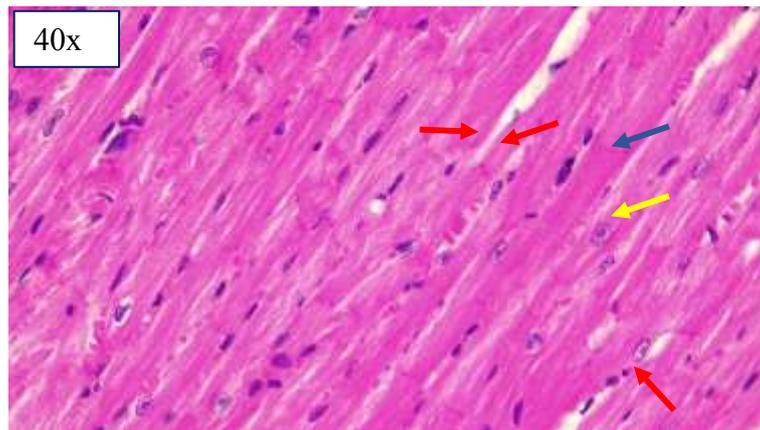


**Figura 11.** Corteza renal – hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL, (40x) H & E. Los túbulos renales mantienen su arquitectura caracterizada por su epitelio cúbico. **A** corteza renal, **flecha amarilla:** corpúsculo renal, **flecha amarilla punteada:** TCP y **flecha punteada roja:** TCD



**Figura 12.** Médula renal - hembra 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. **B** médula renal (los túbulos renales mantienen su arquitectura caracterizada por su epitelio cúbico), # túbulos colectores, **C:** congestión vascular.

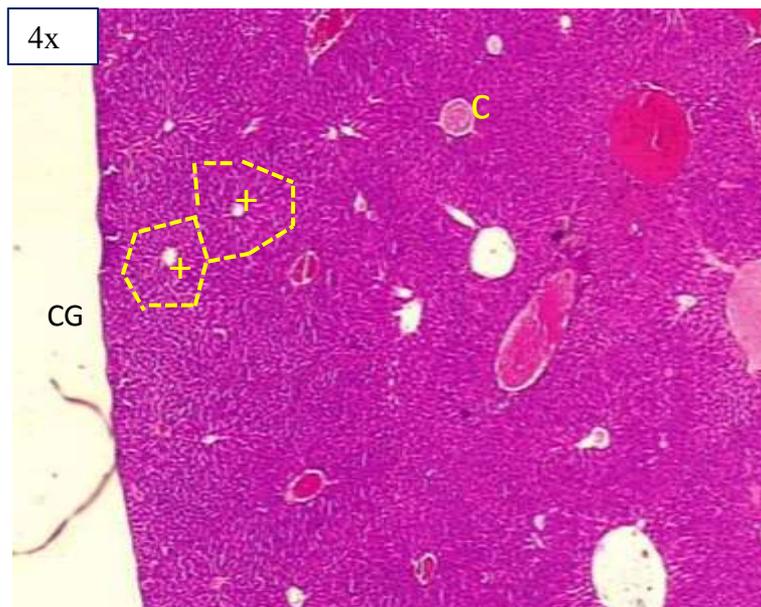
\* **Corazón**



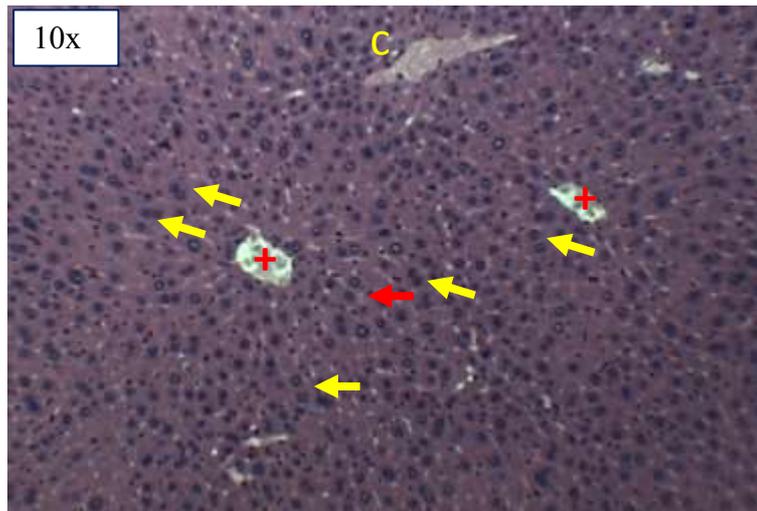
**Figura 13.** Corazón – hembra 30 mg/kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Corte longitudinal de miocardio, se observan **flecha amarilla:** núcleos céntricos, **flechas rojas:** ramificaciones y anastomosis de las fibras musculares. **Flecha azul:** discos interescalares.

**4.1.6.2. Grupo I 30 mg/kg de EEL de PPL: Machos**

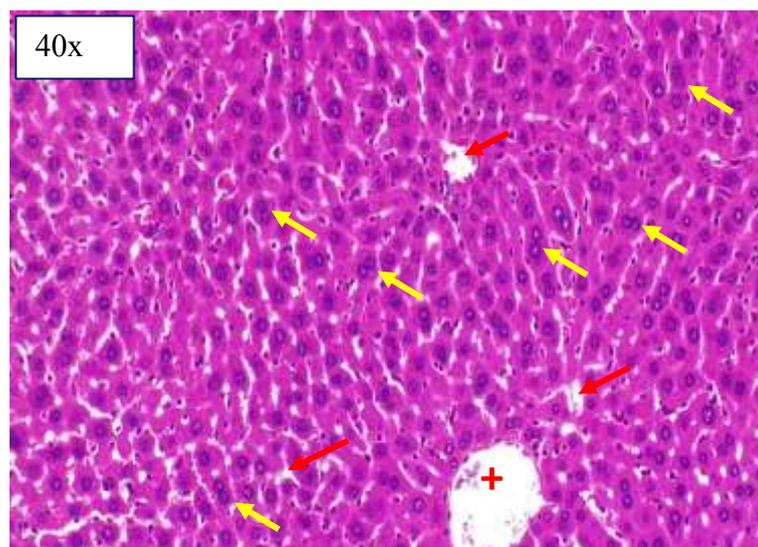
\* **Hígado**



**Figura 14.** Hígado – macho 30 mg/kg de EEL de PPL (10x) H & E. Se observan vasos dilatados, lobulillos hepáticos con las venas centrales dilatadas. Diagnóstico: moderada dilatación y congestión vascular. + vena centrolobulillar, **C** congestión vascular y dilatación y **líneas punteadas:** lobulillo hepático.

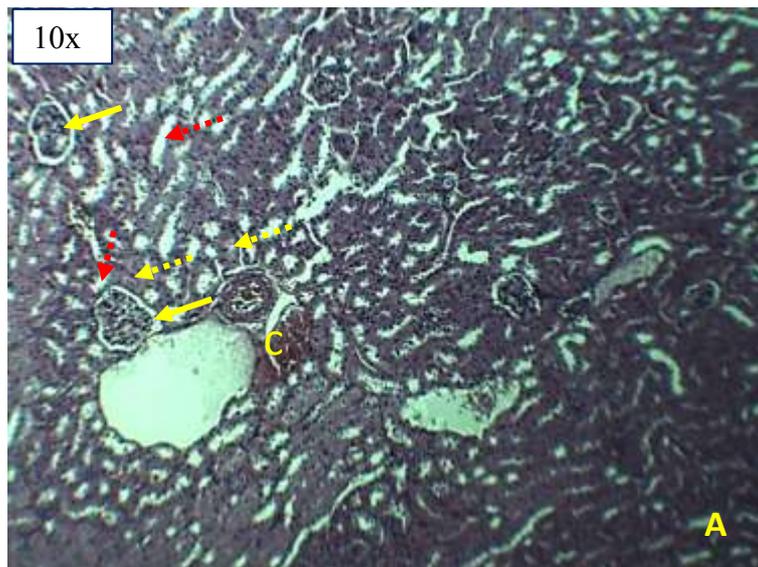


**Figura 15.** Hígado – macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. cordones hepáticos con arquitectura conservada, numerosos hepatocitos binucleados, venas centrales y venas hepáticas dilatadas y congestionadas. Diagnóstico: moderada dilatación y congestión vascular. + vena centrolobulillar, **C** congestión vascular y dilatación, **flecha amarilla:** hepatocitos binucleados, **flechas rojas:** sinusoides hepáticas, **líneas punteadas:** lóbulo hepático.

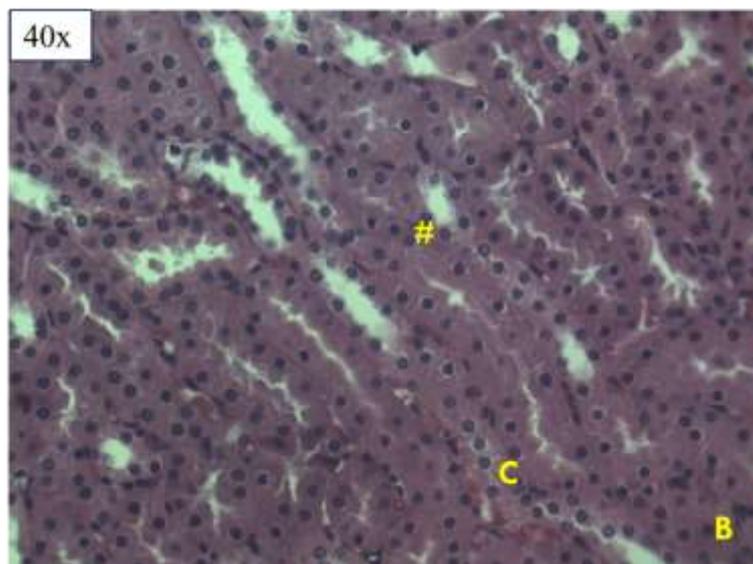


**Figura 16.** Hígado – macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Dilatación y congestión vascular en sinusoides hepáticos y venas centrales, hepatocitos mantienen su orden y varios binucleados. Diagnóstico: moderada congestión y dilatación vascular. + vena centrolobulillar, **flecha amarilla:** hepatocitos binucleados y **flechas rojas:** sinusoides hepáticas.

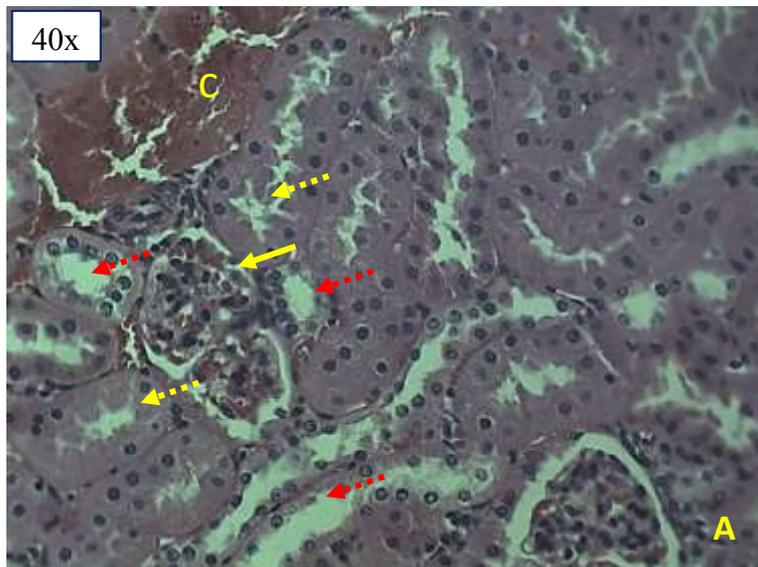
\* **Riñón**



**Figura 17.** Corteza renal - macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. Diagnóstico: moderada dilatación y congestión vascular. **A** corteza renal, **C:** congestión vascular y dilatación **flecha amarilla:** corpúsculo renal, **flecha amarilla punteada:** TCP y **flecha punteada roja:** TCD

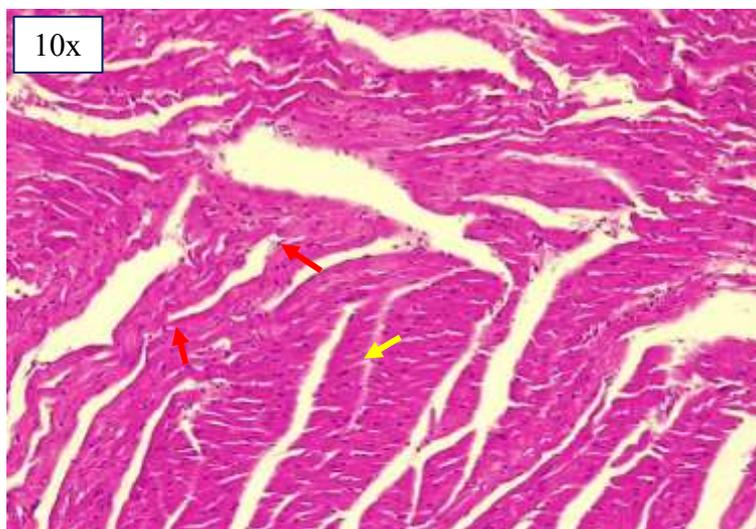


**Figura 18.** Médula renal - macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. **B** médula renal. Los túbulos renales mantienen su arquitectura caracterizada por su epitelio cúbico, vasos sanguíneos dilatados y congestionados, **#** túbulos colectores y **C:** congestión vascular y dilatación.



**Figura 19.** Corteza renal - macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. A corteza renal. Los túbulos renales mantienen su arquitectura caracterizada por su epitelio cúbico, **flecha amarilla:** corpúsculo renal, **flecha amarilla punteada:** TCP y **flecha roja punteada:** TCD.

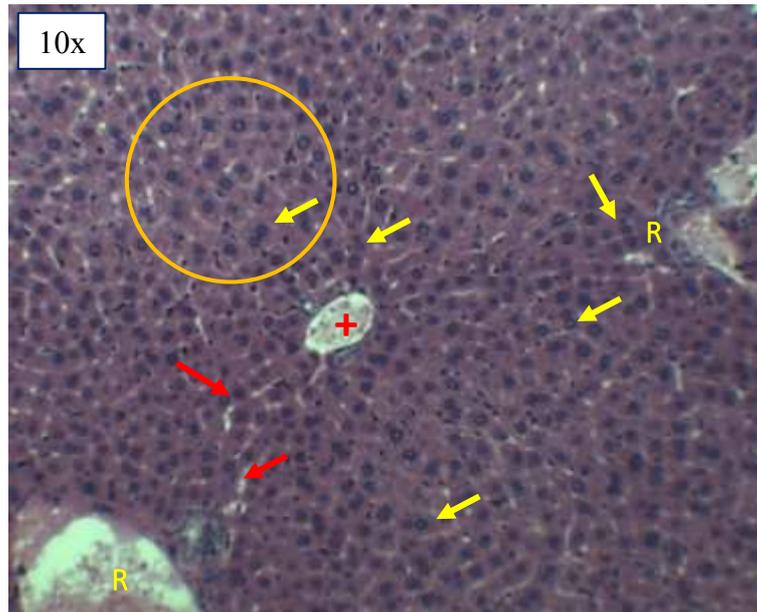
\* **Corazón**



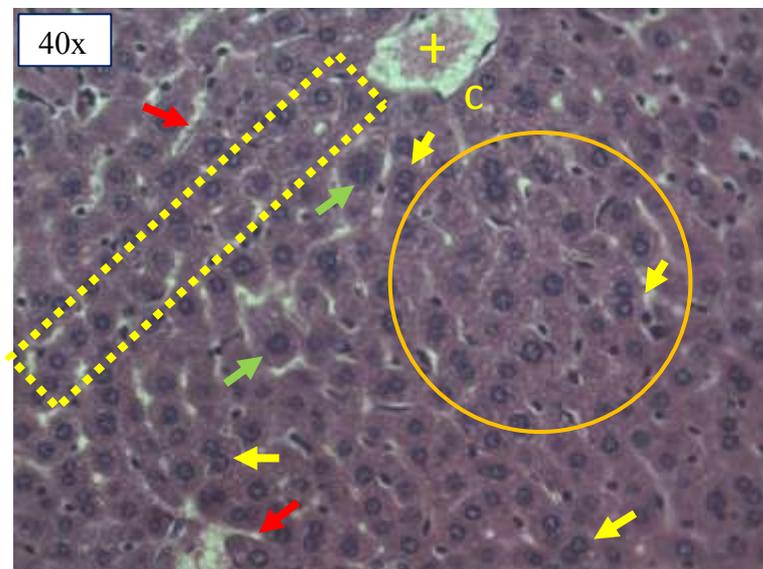
**Figura 20.** Corazón - ratón macho 30 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. corte longitudinal del miocardio, **flecha amarilla:** núcleos céntricos, **flechas rojas:** ramificaciones y anastomosis de las fibras musculares.

#### 4.1.6.3. Grupo II 300 mg./kg. de EEL de PPL: hembras

##### \* Hígado

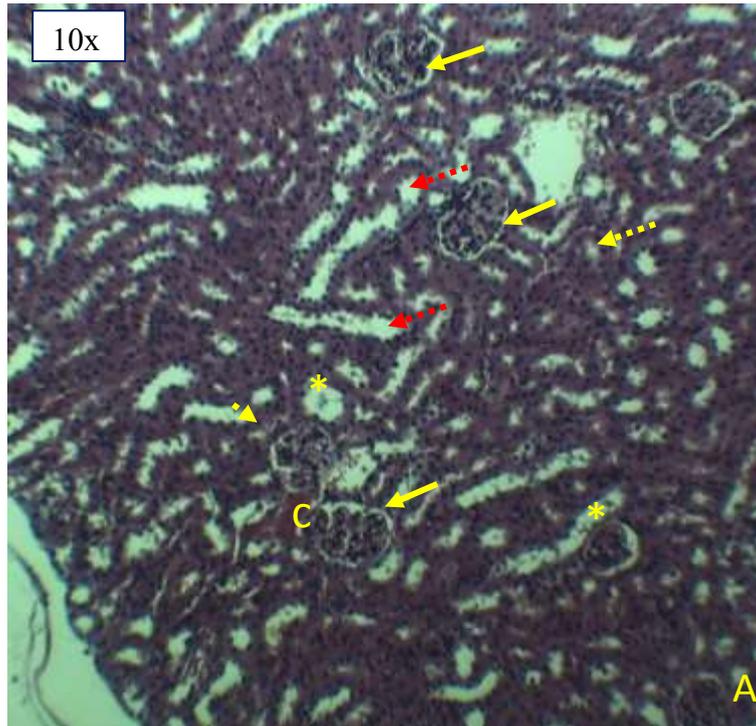


**Figura 21.** Hígado - ratón hembra 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. hepatocitos tumefactos que en grupo aparecen muy apretados y desordenados. Hay células binucleadas y muchas hipertrófica con núcleo sumamente agrandado. Diagnóstico: hepatitis degenerativa vacuolar y dilatación congestión vascular. + vena centrolobulillar, **C** congestión vascular y dilatación, **flecha amarilla:** Hepatocito binucleado, **flechas rojas:** sinusoides hepáticos, **R** rama vena porta y **círculo:** hepatocitos apretados y vacuolados.

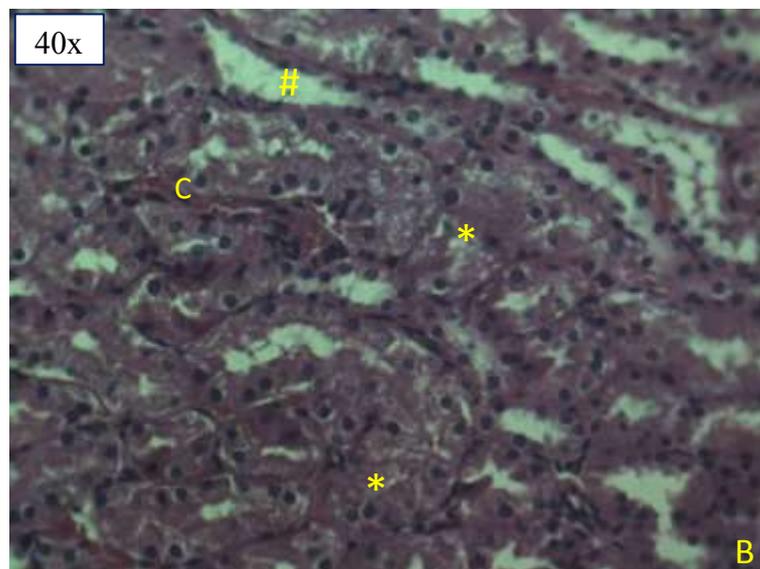


**Figura 22.** Hígado - Ratón Hembra 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Se observa que algunos hepatocitos se encuentran tumefactos, otros pequeños y normales. Los cordones hepáticos se aprecian desordenados. Hay células binucleadas y muchas hipertrófica con núcleo sumamente agrandado. Se observa en algunas áreas dilatación de los espacios sinusoidales. Diagnóstico: dilatación congestión vascular y hepatitis degenerativa vacuolar. + vena centrolobulillar, **C** congestión vascular y dilatación, **flecha amarilla:** hepatocito binucleado, **flechas verdes:** hepatocitos con núcleo agrandado. **Recuadro:** cordones hepáticos, **flechas rojas:** sinusoides hepáticos y **círculo:** hepatocitos apretados y vacuolados.

\* **Riñón**

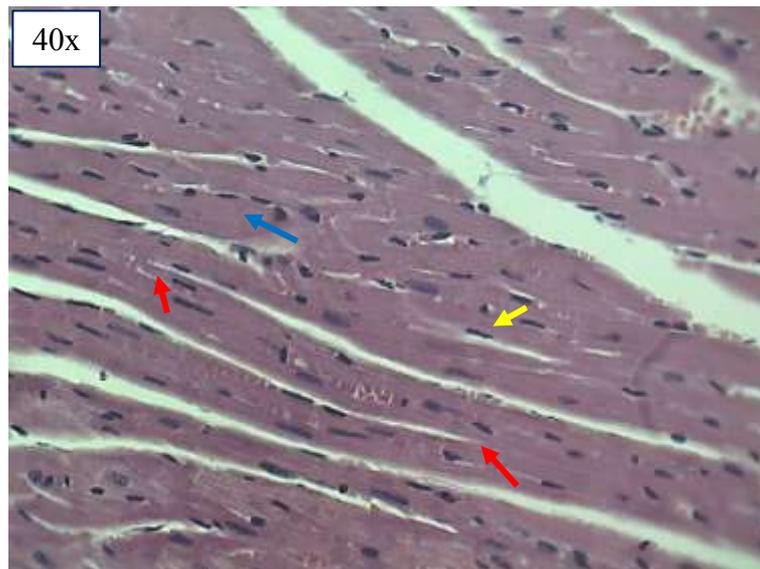


**Figura 23.** Corteza renal - ratón hembra 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. Las células tubulares presentan vacuolas en el citoplasma más severa. Zonas de congestión de vasos sanguíneos. Diagnóstico: nefrosis degenerativa vacuolar del epitelio tubular renal. **A** corteza renal, **C** congestión vascular, **flecha amarilla:** corpúsculo renal, **flecha amarilla punteada:** TCP, **flecha punteada roja:** TCD y \* células vacuoladas.



**Figura 24.** Ratón hembra 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Células epiteliales tubulares con vacuolización en su citoplasma, congestión vascular y dilatación. Diagnóstico: dilatación y congestión vascular y nefrosis degenerativa vacuolar del epitelio tubular renal. **B** médula renal, **C** congestión vascular y # túbulos renales.

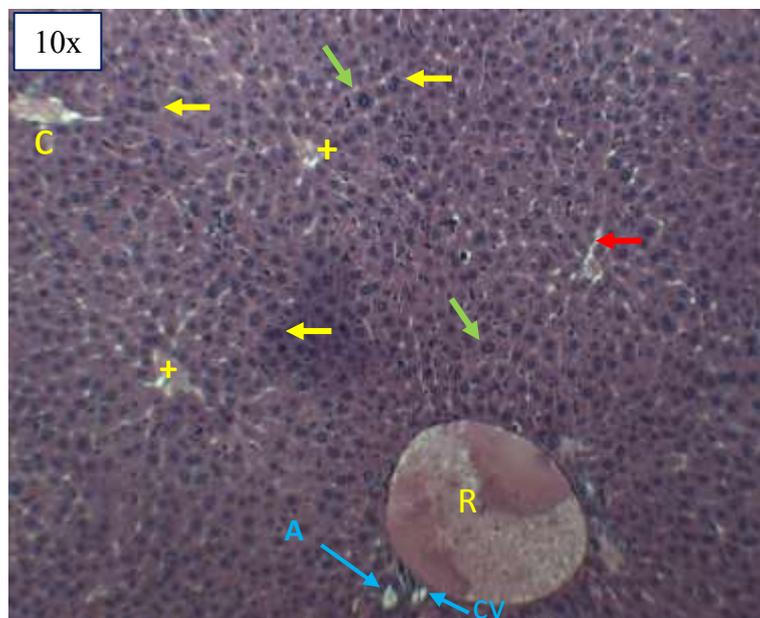
\* Corazón



**Figura 25.** Corazón – macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Corte longitudinal se observan conservada arquitectura del miocardio, sin lesiones visibles. **Flecha amarilla:** núcleos céntricos. **Flechas rojas:** ramificaciones y anastomosis de las fibras musculares. **Flecha azul:** discos interescalares.

4.1.6.4. Grupo II 300 mg./kg. de EEL de PPL: machos

\* Hígado

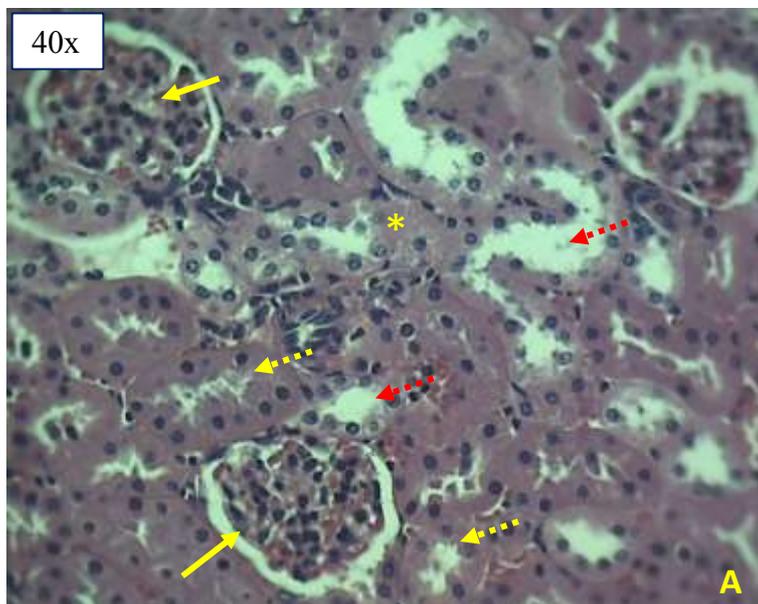


**Figura 26.** Hígado- macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. Hay numerosas células binucleadas y muchas hipertróficas con núcleo sumamente agrandado. Se observa en algunas áreas dilatación de los espacios sinusoidales. Zonas de congestión y dilatación de vasos sanguíneos. Diagnóstico: severa dilatación y congestión vascular. + vena centrolobulillar, **C** congestión vascular y dilatación, **flecha amarilla:** hepatocito binucleado, **flechas rojas:** sinusoides hepáticos, **flechas verdes:** hepatocitos con núcleo agrandado, **R** rama vena porta (dilatada), **cv** conducto biliar y **A** arteria hepática.

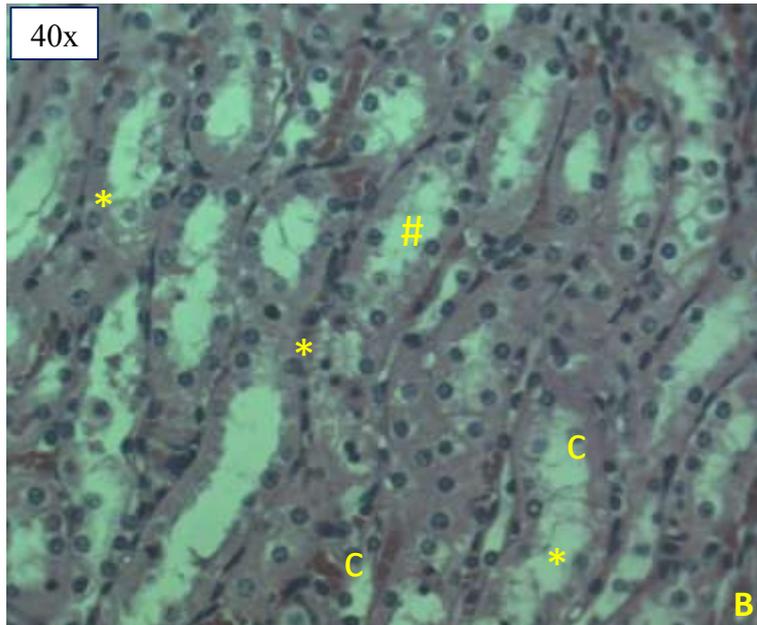


**Figura 27.** Hígado- macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. De forma generalizada se observa que los hepatocitos se encuentran algunos agrandados y otros pequeños y normales, algunos tumefactos y en grupo los hepatocitos aparecen muy apretados. Diagnóstico: hepatitis degenerativa vacuolar. + vena centrolobulillar, C congestión vascular y dilatación. **Recuadro:** cordones hepáticos con hepatocitos desordenados, \* hepatocitos vacuolados, **flecha amarilla:** hepatocito binucleado, **flechas verdes:** hepatocitos con núcleo agrandado y **círculo:** hepatocitos apretados y vacuolados.

\* **Riñón**

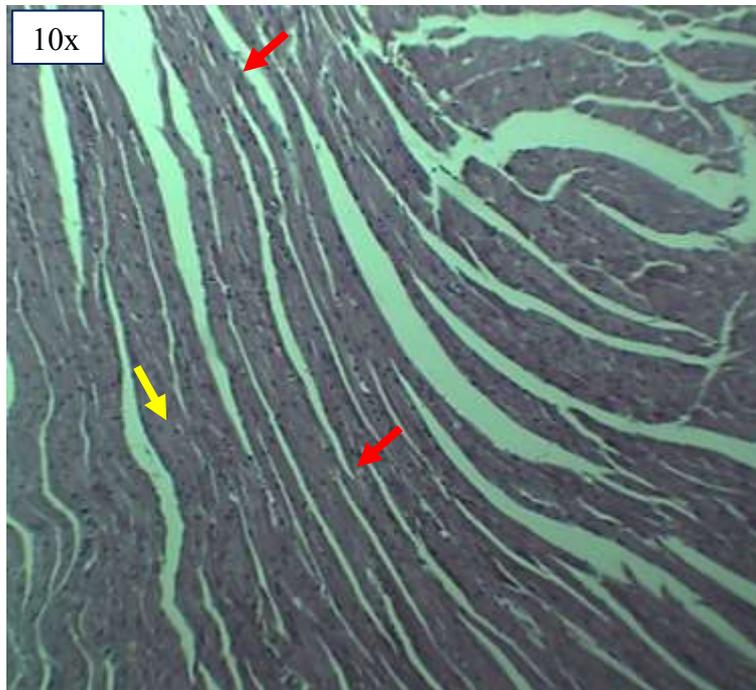


**Figura 28.** Corteza renal - macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Algunos glomérulos se observan engrosados y congestionados. Numerosas células tubulares se presentan vacuoladas. Diagnóstico: congestión vascular y dilatación y degeneración vacuolar. **A:** corteza renal, **C:** congestión vascular, **#:** túbulo renal, **flecha amarilla:** corpúsculo renal, **flecha amarilla punteada:** TCP, **flecha punteada roja:** TCD y **\*:** células vacuoladas.



**Figura 29.** Médula renal - macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Las células de los túbulos presentan hacia el asa de Henle las células vacuolas en el citoplasma más severa. Diagnóstico: nefrosis degenerativa vacuolar del epitelio tubular renal. **B** médula renal, **C** congestión vascular, # túbulos renales y \* células vacuoladas.

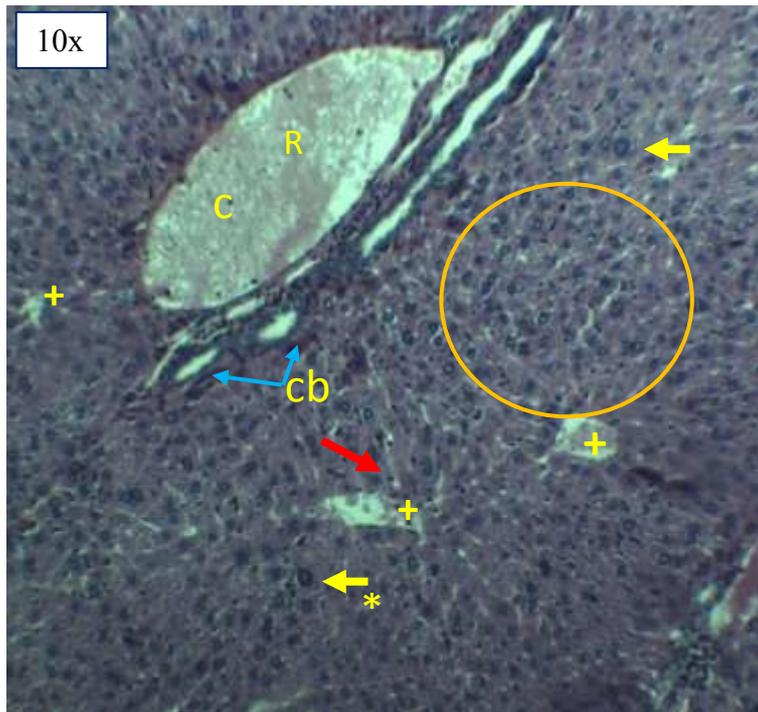
\* **Corazón**



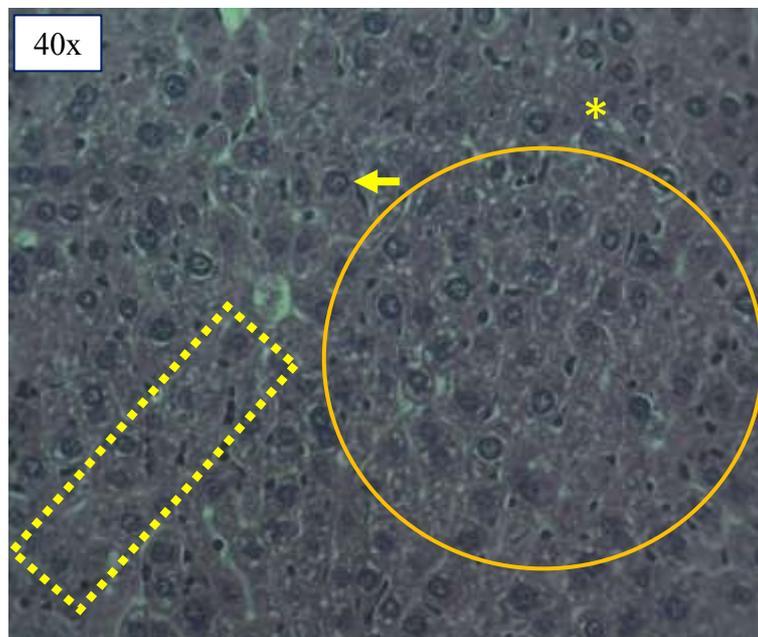
**Figura 30.** Corazón - macho 300 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. Corte longitudinal se observa conservada arquitectura del miocardio, sin lesiones visibles; **flecha amarilla:** núcleos céntricos, **flechas rojas:** ramificaciones y anastomosis de las fibras musculares.

#### 4.1.5.5. Grupo III 500 mg./kg. de EEL de PPL: hembras

##### \* Hígado

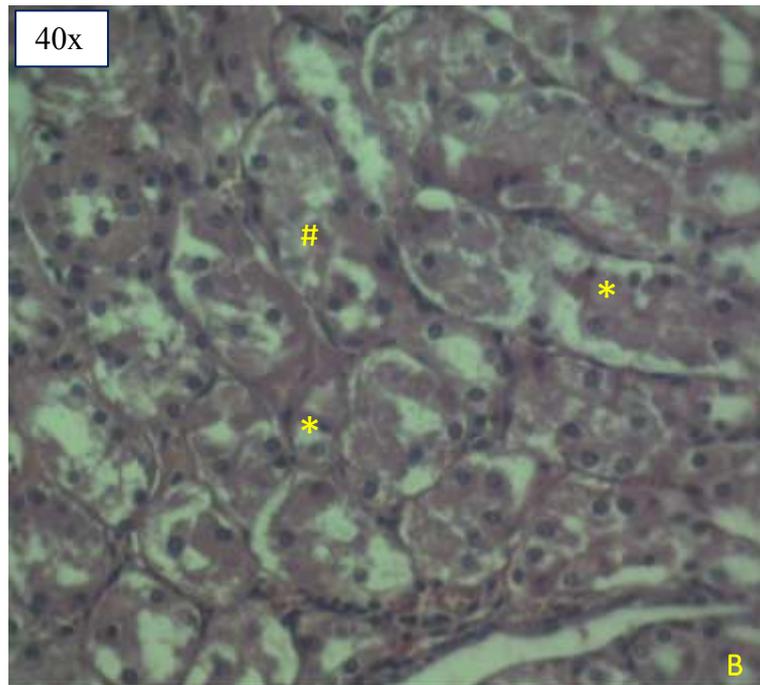


**Figura 31.** Hígado - ratón hembra 500 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. Zonas de células parenquimatosas con tumefacción. Diagnóstico: degeneración vacuolar hepática y dilatación y congestión vascular. + vena centrolobulillar, **C** congestión vascular y dilatación, **flecha amarilla:** hepatocito núcleo agrandado, **flechas rojas:** sinusoides hepáticos, **R** rama vena porta, **círculo:** hepatocitos apretados y vacuolados, **cb:** conducto biliar y \* hepatocitos vacuolados.

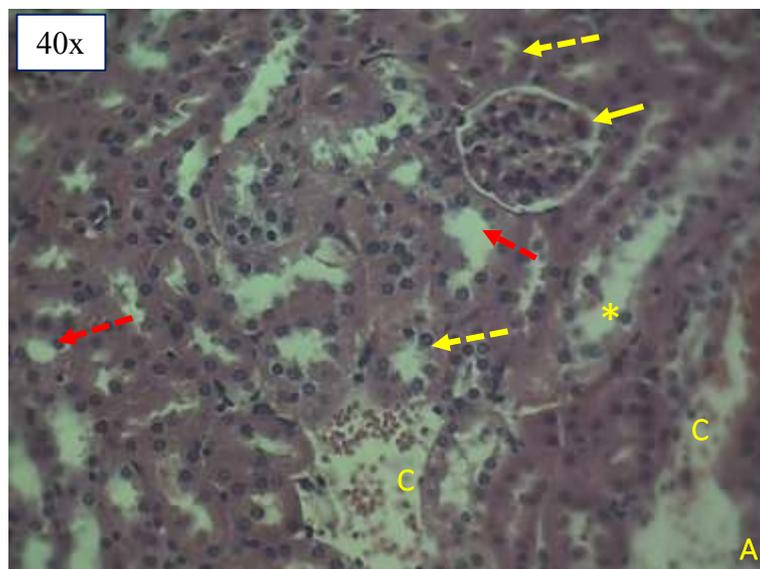


**Figura 32.** Hígado - ratón hembra 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Se observan zonas de células parenquimatosas con tumefacción y muchas células vacuoladas. Los cordones hepáticos han perdido su arquitectura, por zonas se muestran desordenados y apretados. Diagnóstico: moderada tumefacción turbia y degeneración vacuolar hepática. **Recuadro:** cordones hepáticos, **flecha amarilla:** hepatocito núcleo agrandado y \* hepatocitos vacuolados.

\* **Riñón**

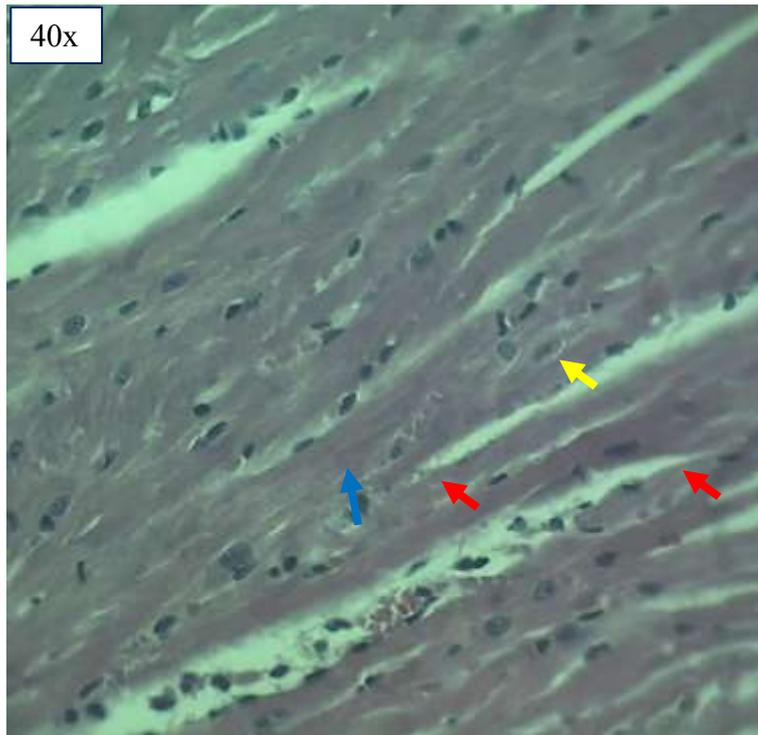


**Figura 33.** Médula renal - ratón hembra 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Se puede apreciar a las células tubulares con vacuolas en el citoplasma. Diagnóstico: nefrosis degenerativa vacuolar del epitelio tubular renal. **B** médula renal, # túbulos renales y \* células vacuoladas.



**Figura 34.** Corteza Renal - ratón hembra 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. En varias zonas los vasos sanguíneos se presentan dilatados y congestionados. Diagnóstico: dilatación y congestión vascular y nefrosis degenerativa vacuola del epitelio tubular renal. **A** corteza renal, **C** congestión vascular, **flecha amarilla:** corpúsculo renal, **flecha amarilla punteada:** TCP, **flecha roja punteada:** TCD y \* células vacuoladas.

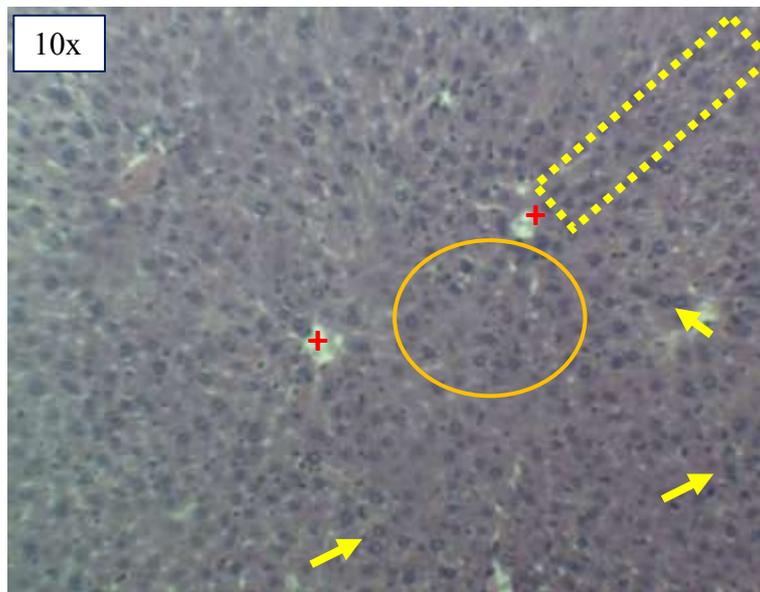
\* Corazón



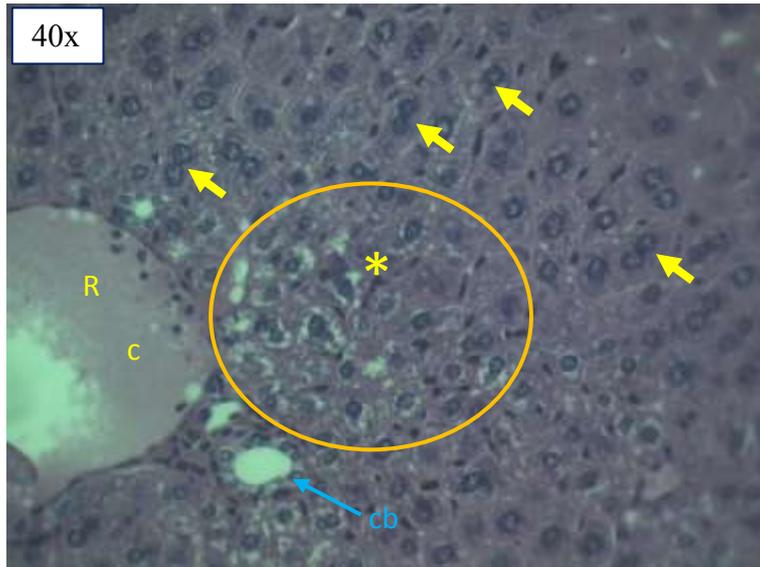
**Figura 35.** Corazón - ratón hembra 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Se observan las células cardíacas en un corte longitudinal, conservada arquitectura del miocardio SLV; **flecha amarilla:** núcleos céntricos, **flecha roja:** ramificaciones y anastomosis de fibras del miocardio y **flecha azul:** discos interescalares.

4.1.5.6. Grupo III 500 mg./kg. de EEL de PPL: machos

\* Hígado

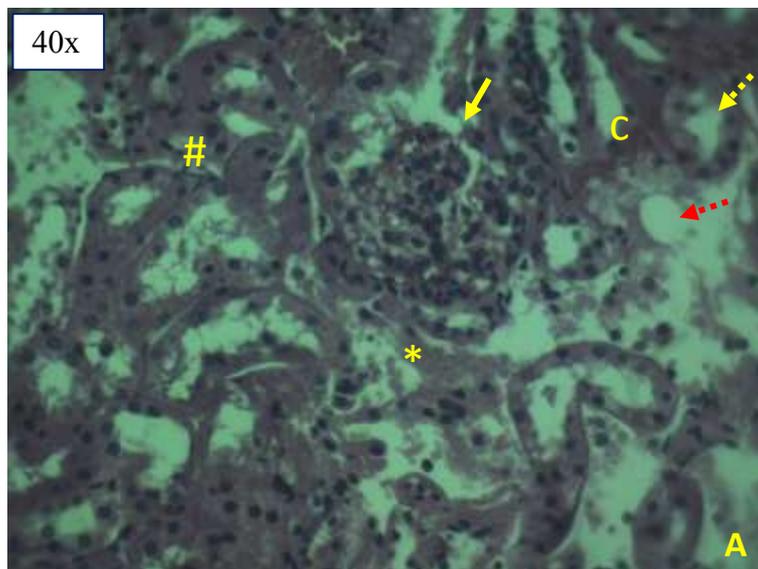


**Figura 36.** Hígado corazón - ratón macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (10x) H & E. Se puede observar vena centrolobulillar congestionada, zonas con los hepatocitos con apariencia de estar apretados y desordenados. Diagnóstico: moderada tumefacción turbia y degeneración vacuolar hepática; **flechas amarillas:** hepatocitos binucleados; **recuadro:** cordones hepáticos y **círculo:** hepatocitos apretados y vacuolados.

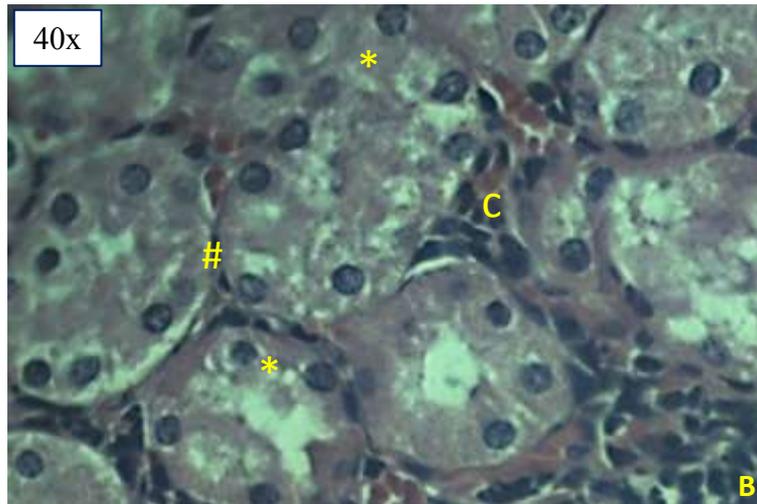


**Figura 37.** Hígado corazón - ratón macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Se observan zonas de congestión de vasos sanguíneos. Se observan múltiples zonas de células parenquimatosas con tumefacción y muchas vacuoladas, dilatación y congestión de los vasos sanguíneos. Diagnóstico: Moderada tumefacción turbia y degeneración vacuolar hepática y congestión vascular. + vena centrolobulillar, **C** congestión vascular y dilatación; **recuadro**: cordones hepáticos; **flechas amarillas**: hepatocitos binucleados, \* hepatocitos vacuolados, **R** rama vena porta (dilatada), **cb** conducto biliar y **círculo**: hepatocitos apretados y vacuolados.

\* **Riñón**

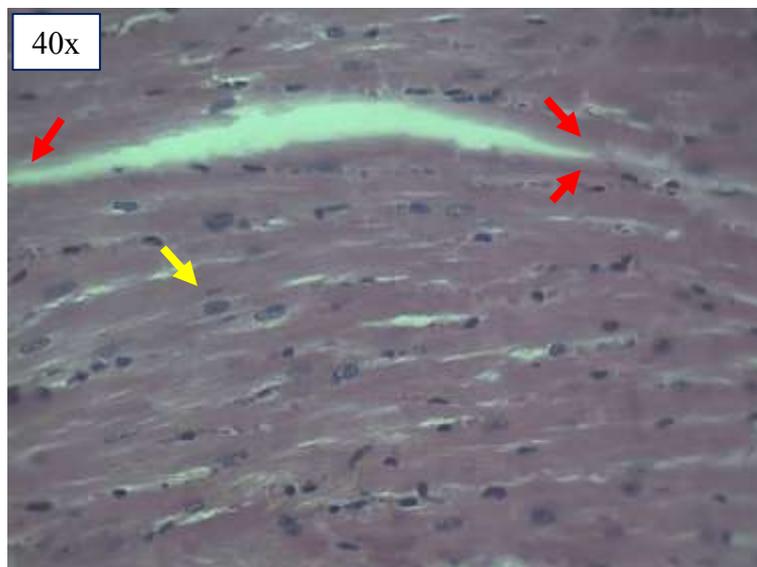


**Figura 38.** Corteza renal corazón - ratón macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Se muestran las células tubulares con presencia de vacuolas en su citoplasma. Diagnóstico: nefrosis degenerativa vacuolar del epitelio tubular renal. **A** corteza renal, **C** congestión vascular, # túbulo renal; **flecha amarilla**: corpúsculo renal; **flecha amarilla punteada**: TCP; **flecha roja punteada**: TCD y \* células vacuoladas.



**Figura 39.** Médula renal corazón - ratón macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. En los túbulos se muestran células que presentan vacuolas en el citoplasma más severas, y hay zonas con dilatación y congestión vascular. Diagnóstico: nefrosis degenerativa vacuolar del epitelio tubular renal y dilatación y congestión vascular. **C** congestión vascular, **#** túbulos renales, y **\*** células vacuoladas.

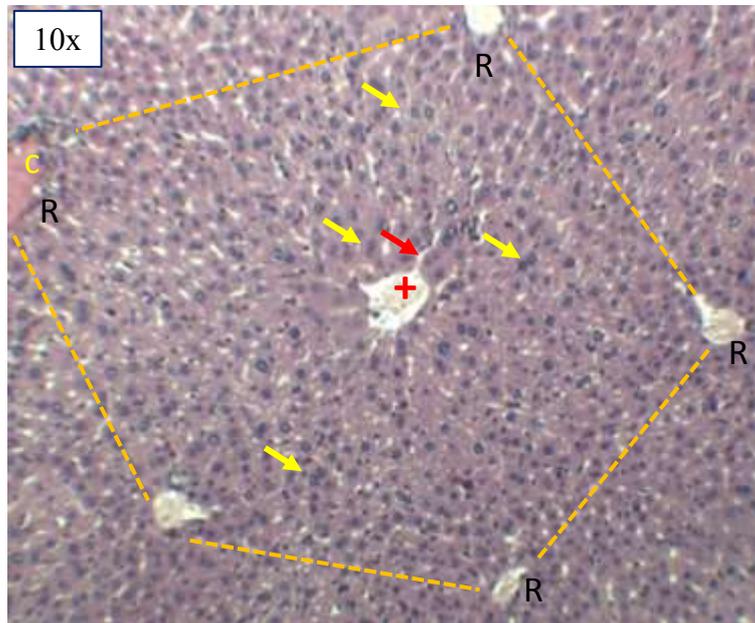
\* **Corazón**



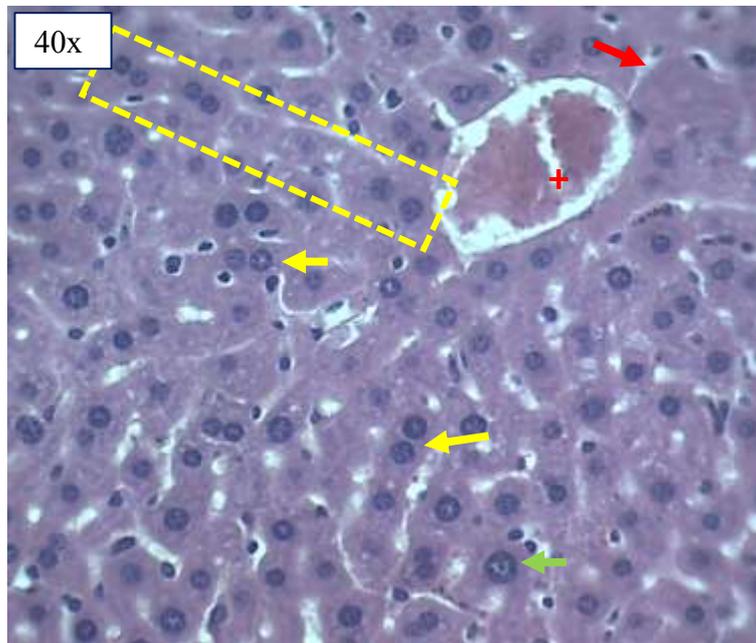
**Figura 40.** Corazón - ratón macho 500 mg./kg. de EEL de PPL (40x) H & E. Conservada arquitectura del miocardio, núcleo central en las fibras musculares, y se observan las ramificaciones y anastomosis de las mismas. **SLV**; **flecha amarilla**: núcleo central y **flecha roja**: ramificaciones y anastomosis.

#### 4.1.5.7. Grupo control 00 mg./kg. de EEL de PPL: hembras

##### \* Hígado

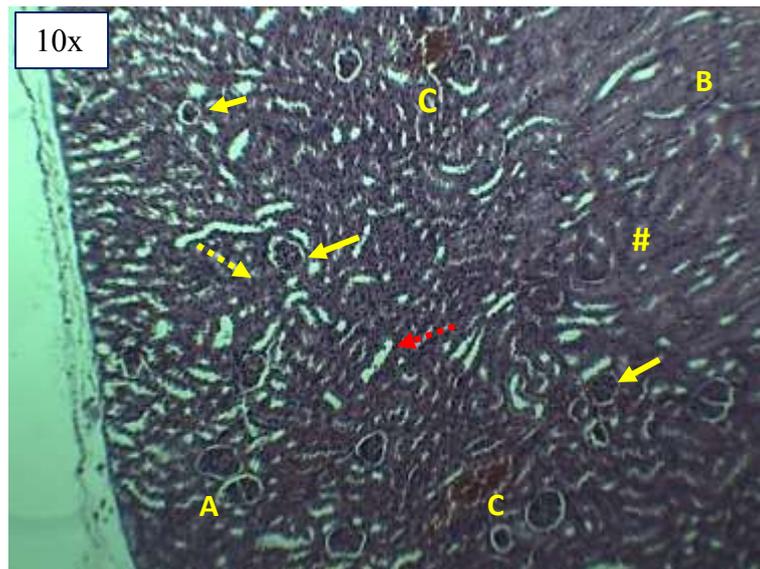


**Figura 41.** Hígado - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL – control (10x) H & E. Se puede observar un lóbulo hepático, vasos sanguíneos congestionados y dilatados, disposición de hepatocitos ordenados formando los cordones hepáticos. Diagnóstico: dilatación y congestión vascular. **Líneas punteadas:** lobulillo hepático, + vena centrolobulillar (congestionada), + vena centrolobulillar (congestionada, **flecha amarilla:** hepatocito binucleado, **flechas rojas:** sinusoides hepáticos y **R** rama vena porta (dilatadas y congestionadas).

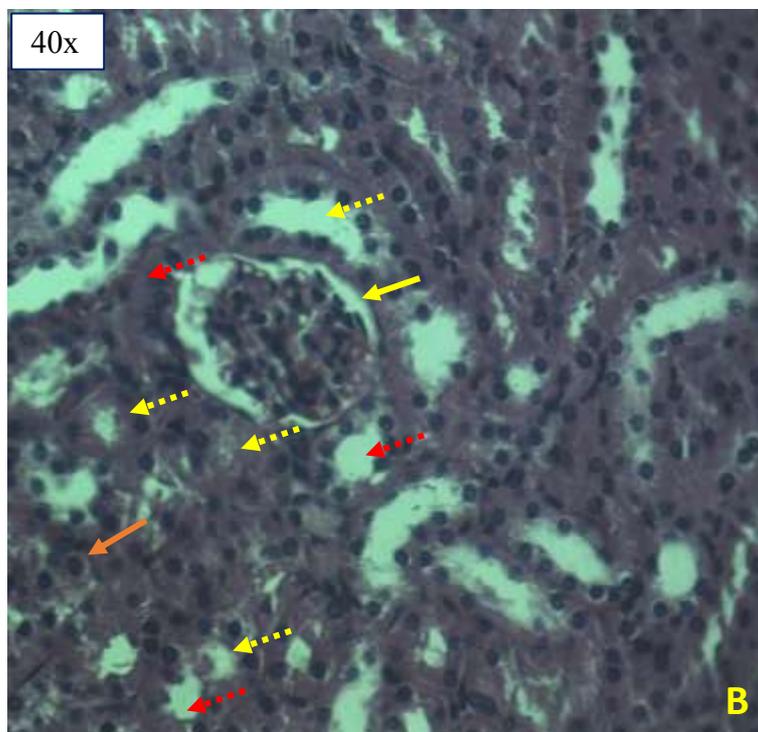


**Figura 42.** Hígado - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (40x) H & E. Se puede observar que los hepatocitos tienen ordenada disposición, conformando los cordones hepáticos; vena centrolobulillar está dilatada y congestionada. Diagnóstico: dilatación y congestión vascular, + vena centrolobulillar (congestionada); **flecha amarilla:** hepatocito binucleado; **recuadro:** cordones hepáticos y **flecha verde:** hepatocito núcleo agrandado.

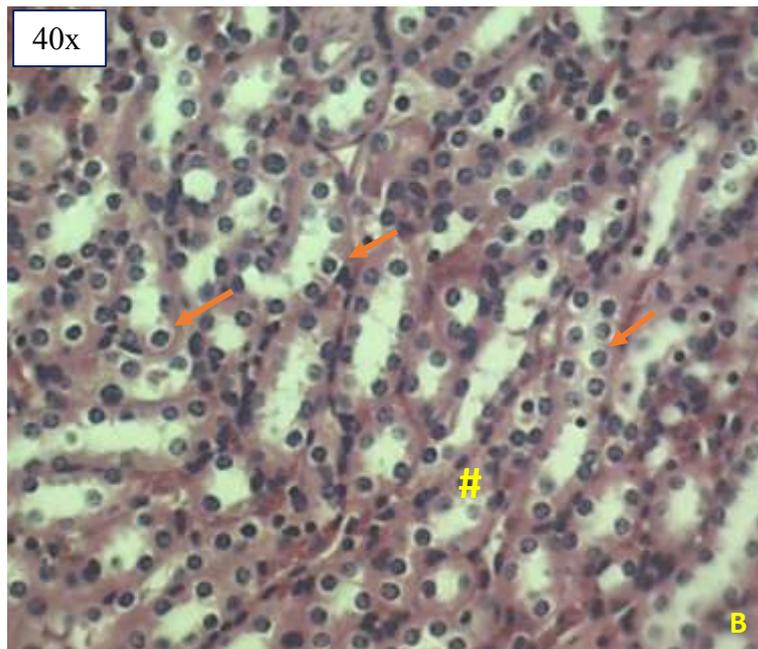
\* **Riñón**



**Figura 43.** Corteza renal - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (10x) H & E. Se observa la corteza renal con numerosos corpúsculos renales, varias zonas con vasos congestionados; se pueden diferenciar los TDD (que tienen luz en su interior) y los TCP (luz estrecha) y el área medular hacia la derecha (**B**) con numerosos túbulos cortados longitudinal y transversalmente. Diagnóstico: dilatación y congestión vascular. **A** corteza renal, **B** Médula renal, **C** congestión vascular, # túbulos renales; **flecha amarilla:** corpúsculo renal; **flecha amarilla punteada:** TCP y **flecha roja punteada:** TCD.

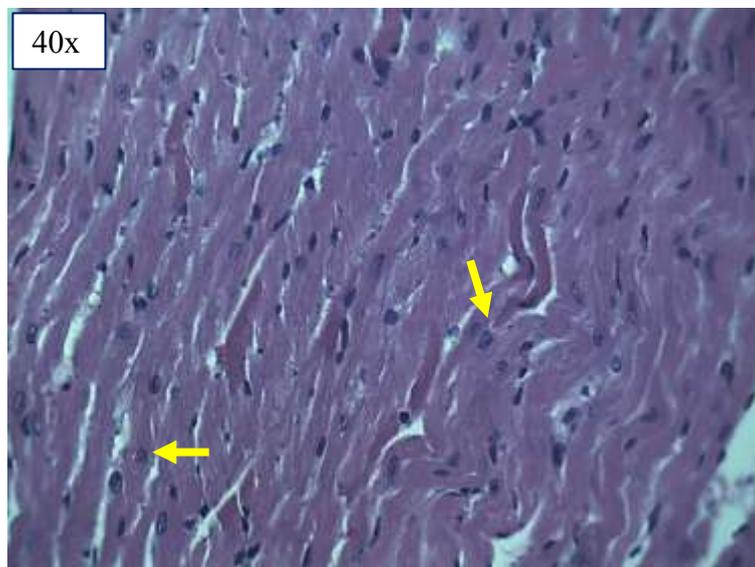


**Figura 44.** Médula renal - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (40x) H & E. Corte longitudinal y transversal de los TCP y TCD, arquitectura mantenida con característico tejido epitelial cilíndrico simple. SLV. **A** corteza renal, **C** congestión vascular; **flecha naranja:** célula epitelial normal; **flecha amarilla:** corpúsculo renal; **flecha amarilla punteada:** TCP, y **flecha roja punteada:** TCD.



**Figura 45.** Médula renal - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (40x) H & E. Epitelio tubular, conservado epitelio cilíndrico siempre. SLV. **B** médula renal, **C** congestión vascular, # túbulos renales, y **flechas naranjas:** célula epitelial normal.

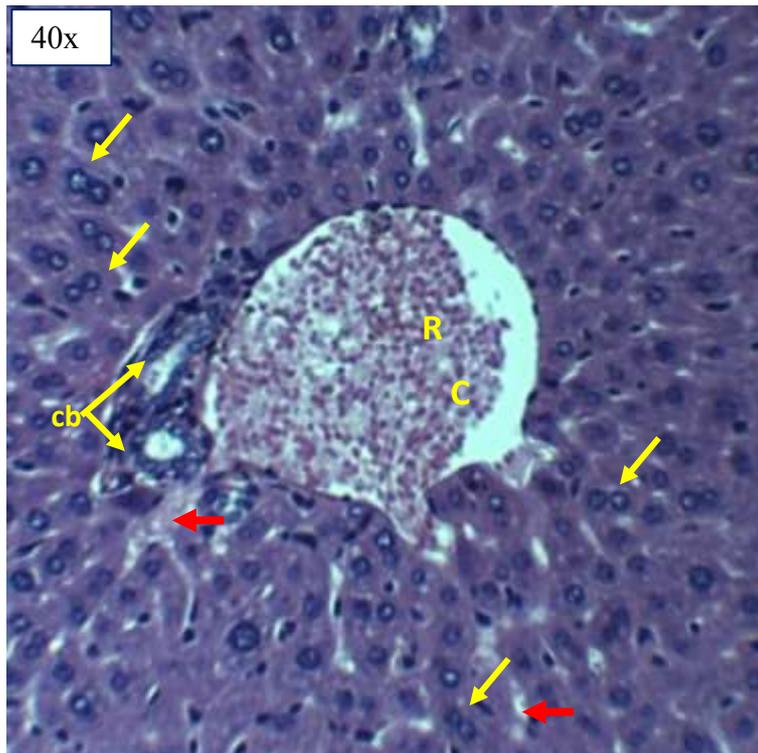
\* Corazón



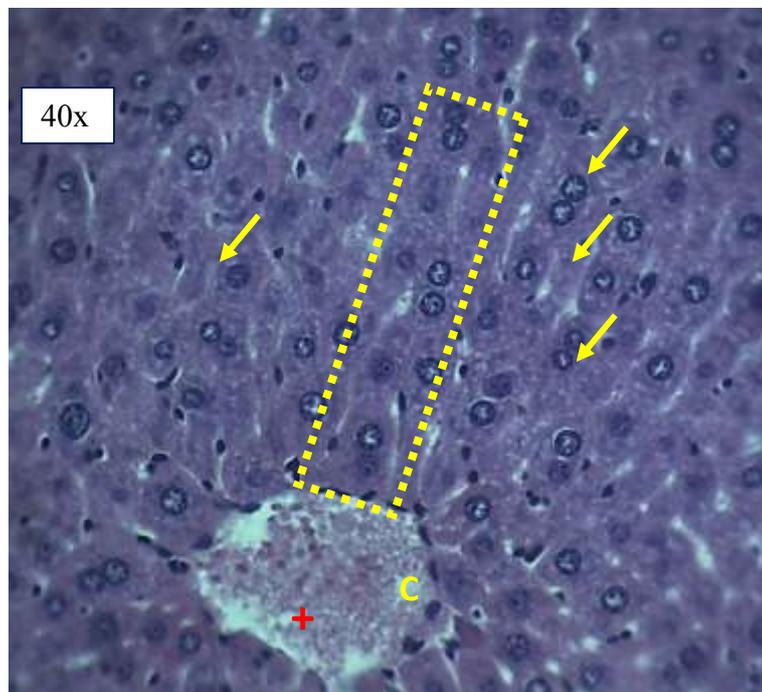
**Figura 46.** Corazón - ratón hembra 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (40x) H & E. Se observan las células cardíacas en un corte longitudinal, conservada arquitectura del miocardio SLV; **flecha amarilla:** núcleos céntricos.

#### 4.1.5.8. Grupo control 00 mg/kg de EEL de PPL: Machos

##### \* Hígado

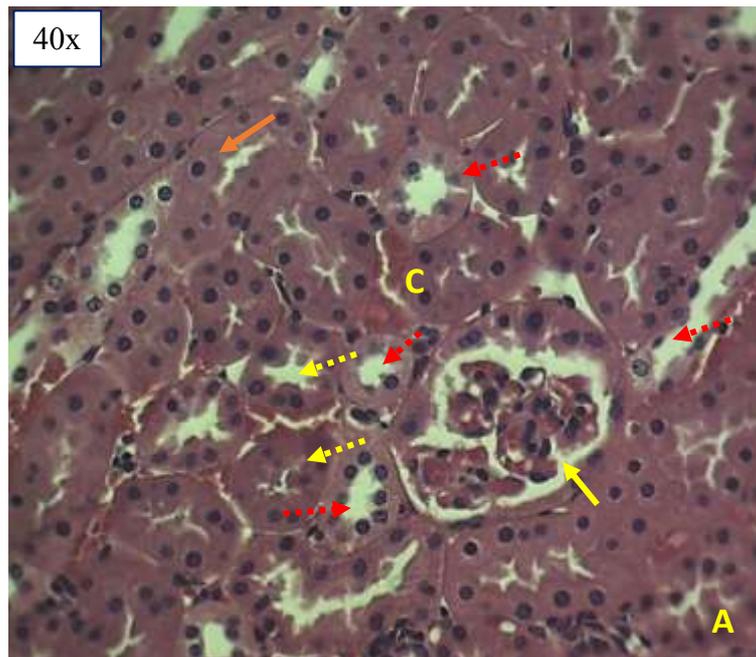


**Figura 47.** Triada portal - ratón macho 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (40x) H & E. Numerosos hepatocitos binucleados, sinusoides hepáticos y rama de la vena hepática dilatados y congestionados. Se muestran los conductos biliares con su epitelio cúbico simple. Diagnóstico: dilatación y congestión vascular. **C** congestión vascular y dilatación; **flechas rojas:** sinusoides hepáticos; **flechas amarillas:** hepatocitos binucleados, **R** rama vena porta (dilatada), **cb** conducto biliar.

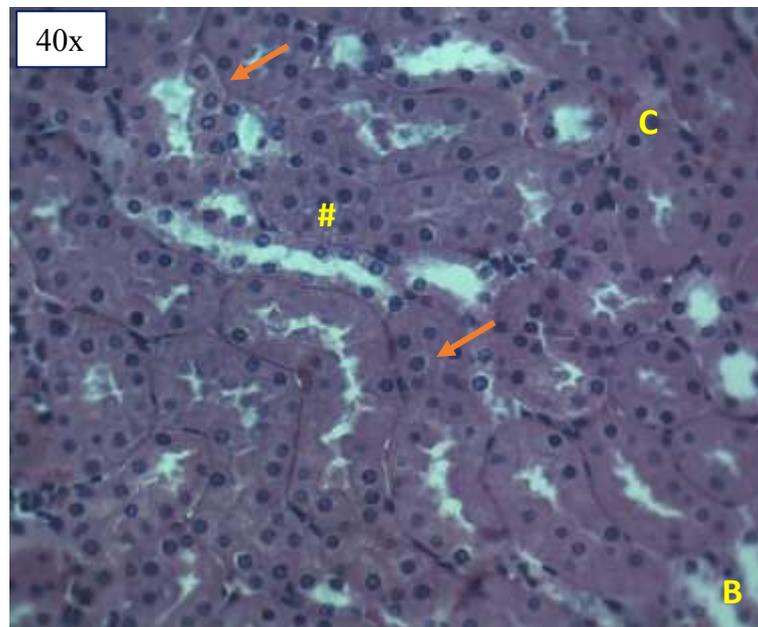


**Figura 48.** Hígado - ratón macho 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (40x) H & E. Cordones hepáticos mantienen su arquitectura, los hepatocitos SLV, algunos hepatocitos binucleados; vena centrolobulillar congestionada y ligeramente dilatada. Diagnóstico: dilatación y congestión vascular + vena centrolobulillar, **C** congestión vascular y dilatación; **flecha amarilla:** hepatocito binucleado; **recuadro:** cordones hepáticos.

\* **Riñón**

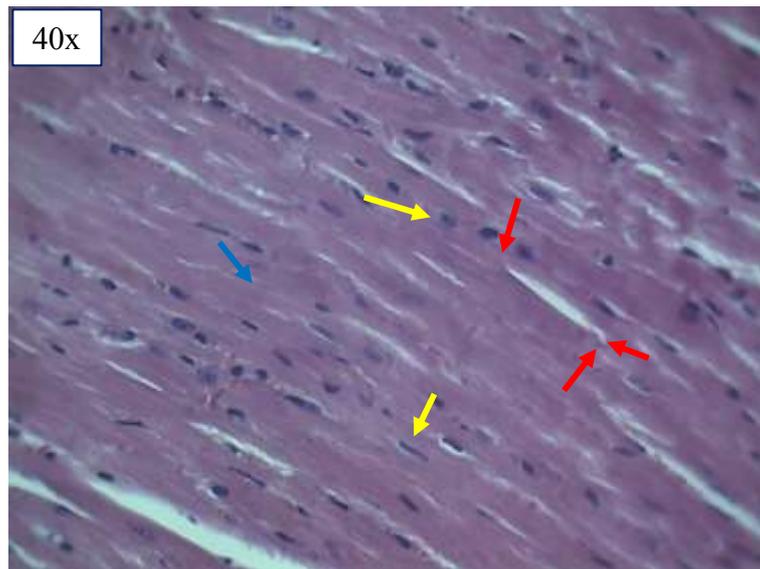


**Figura 49.** Corteza renal - ratón macho 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (40x) H & E. Varias zonas con dilatación vascular y congestión. Los TCP y TCD mantienen su epitelio característico SLV. Diagnóstico: dilatación y congestión vascular. **A** corteza renal, **C** congestión vascular; **flecha naranja:** célula epitelial; **flecha amarilla:** corpúsculo renal; **flecha amarilla punteada:** TCP, y **flecha roja punteada:** TCD.



**Figura 50.** Médula renal - ratón macho 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (40x) H & E. Células epiteliales cilíndricas simples mantienen su estructura y SLV. Zonas con dilatación vascular y congestión. Diagnóstico: dilatación y congestión vascular. **B** médula renal, **C** congestión vascular, **#** túbulos renales; **flecha naranja:** célula epitelial, y **flecha amarilla:** corpúsculo renal.

\* **Corazón**



**Figura 51.** Corazón - ratón macho 00 mg./kg. de EEL de PPL - control (40x) H & E. Corte longitudinal. Se observa una conservada arquitectura del miocardio; **flecha amarilla:** núcleos céntricos; **flechas rojas:** ramificaciones y anastomosis de las fibras musculares; **flecha azul:** discos intercalares.

## DISCUSIÓN

Con el fin de establecer seguridad y eficacia en el uso de plantas y productos derivados de ellas, se viene realizando investigación científica (Lee *et al*, 2012). Motivo por el cual, este trabajo se suma a la investigación al evaluar la Toxicidad oral subcrónica del extracto etanólico liofilizado del fruto de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*) en ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*, utilizando tres dosis del EEL 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. más un grupo control al que se le administró cloruro de sodio; los cuatro grupos estuvieron conformados por 4 ratones machos y 4 hembras. El estudio de órganos contempla el hígado y corazón; sin embargo, por literatura que menciona como efecto a la administración de altas dosis de liofilizado del fruto de PPL puede inducir trombocitopenia en hembras y lesiones al miocardio en machos (Perk *et al*, 2013). Al momento de la necropsia se decidió tomar en cuenta al corazón para ser analizado del mismo modo que el hígado y el riñón.

Al evaluar los parámetros de vida, podemos decir que, durante los 90 días del estudio, los ratones machos y hembras no mostraron signos ni síntomas conductuales compatibles con intoxicación oral al consumir EEP de PPL en ninguna de las dosis y tampoco mortalidad dentro de las 24 primeras horas. Del mismo modo, tal como muestra la tabla 4, la mortalidad fue del 0%, a pesar de que no hay datos en la literatura que precisen el valor de DL50; en este trabajo, la DL50 es mayor que 500 mg./kg., mientras que en un trabajo de toxicidad subcrónica usando jugo de frutas liofilizado en ratas *Wistar* hembra y macho indicó que el valor LD50 de la sustancia fue mayor que 5000 mg./kg. (Perk *et al*, 2013).

De similar modo ocurrió en un estudio de toxicidad aguda de PPL en ratones, donde se determinó que la DL50 era mayor que 2000 mg./kg. (Romero *et al*, 2018).

El incremento de peso corporal en el tiempo, si bien difiere del metabolismo de cada organismo, los 32 ratones, alimentados con la misma dieta y manipulados del mismo modo y por el mismo operador durante los 92 días, disminuyeron los factores externos que puedan alterar los resultados. La Figura 3 muestra los pesos de los ratones hembras durante las 13 semanas, y se ve que, a la tercera semana, los pesos bajan considerablemente en los 4 grupos; luego, progresivamente, van incrementando el peso. Del mismo modo, sucede en la Figura 4 de los pesos de los ratones machos que, a la semana 3, perdieron peso en la curva de tiempo. Esto puede deberse al estrés ocasionado por la administración del EEL, por sonda esofágica que puede generar lesiones y producir dolor al momento de deglutir.

Al evaluar estadísticamente los pesos, se realizó la prueba multivariante (Tabla 5); la cual nos indica que la relación de la ganancia de peso en relación con el tiempo/sexo/dosificación no es estadísticamente significativa al ser 0,11. Posteriormente, al realizar la prueba intrasujetos (Tabla 6), a pesar de que fue altamente significativa la relación peso/tiempo (0,00) y la relación peso/tiempo/sexo (0,00), al evaluar la relación de los factores peso/tiempo/sexo/dosificación, el valor hallado fue de 0,13, que es mayor que el 0,05; lo que indica que, a pesar de que la gráfica muestre diferencias visuales de las variaciones de los pesos tanto en hembras como en machos, esos cambios no son estadísticamente significativos. Por ello se puede decir que el EEL no tuvo efecto sobre la ganancia del peso de los ratones hembras ni machos en las diferentes dosis en el período de 90 días, y que el EEL del fruto de PPL puede no tener un efecto negativo sobre el aumento de peso. Finalmente se realizó la prueba de normalidad (Tabla 7), en la que se comprobó que todos los datos cumplían con tener distribución normal, representada en

gráficos de los apéndices 10 y 11. Un panorama parecido se tuvo en las dosis de 100, 500 y 5000 mg./kg. de EEL del fruto de PPL, que pese al cambio de peso en las gráficas durante las 13 semanas del estudio, la variación del peso de acuerdo con el tiempo y sexo no fue estadísticamente significativa (Kasali *et al*, 2013).

Después de la necropsia se evaluaron los órganos hígado, riñón y corazón, donde, a la evaluación macroscópica no se evidenciaron lesiones visibles; se pesaron cada uno tal como indica el protocolo y se realizaron los análisis estadísticos con ANOVA. El primero, mediante estadísticos descriptivos (Tabla 8), muestra el resumen de los pesos de los órganos por grupo de tratamiento. Allí quedan indicadas sus medias y la desviación estándar. Posteriormente, se comprobó que los datos cumplan con tener distribución normal mediante Shapiro – Wilk (Tabla 9); todos los datos fueron mayores que 0,05. Después se hizo lo mismo para la prueba de homocedasticidad, mediante el estadístico de Levene (Tabla 10), en donde, las varianzas de hígado y corazón son estadísticamente homogéneas, debido a que sus variables fueron mayores que 0,05, y que riñón mostraba ser distinta estadísticamente, debido a que su varianza calculada fue de 0,043. Todo ello podría reflejar que existió una afectación estadísticamente significativa mediante Levene en este órgano, a diferencia del hígado y corazón que no muestran variaciones.

En seguida, se realizó la prueba de efectos de intersujeto (Tabla 11), que nos indica la interacción entre los 3 factores, y, al evaluar cada uno por separado, el riñón sigue siendo altamente significativo, con un valor de 0,001; sin embargo, cuando se evalúan los tres órganos juntos, se obtienen valores mayores que 0,05; así: 0,435, 0,148 y 0,442 para hígado, riñón y corazón, respectivamente. En definitiva, el estudio indicó que, según los pesos, no hay interacción estadística significativamente entre estos tres órganos.

Como análisis posterior a su análogo de la varianza se realizó la prueba de Tukey (Tabla 12), en la cual se hace la comparación de medias por órganos, con el fin de analizar los grupos de tratamiento con los pesos de cada órgano. Al respecto, se concluyó que no existen variaciones estadísticamente significativas en los pesos de los órganos riñón, hígado y corazón de los 4 grupos de tratamiento; sin embargo, se tuvo significancias mayores a 0,05 en todos los casos; hígado 0,316, riñón 0,104 y corazón 1,160.

Finalmente, en los gráficos de medias marginales por peso de hígado (Figura 5) podemos apreciar que, en las medias del grupo de machos, fueron los del grupo control los que tuvieron el mayor peso; mientras que en las hembras se mantuvo casi constante en todos los grupos; sin embargo, en el grupo 2, tanto hembras como machos, muestran un mayor peso en comparación con los grupos 1 y 3. Consecuentemente, el comportamiento de las medias de los pesos de hígado en los grupos tratados en comparación con el control no muestra los cambios esperados, ya que se pensaba que el EEL del fruto de PPL podría repercutir en el aumento de peso por el metabolismo de los carbohidratos y los posteriores depósitos que hay en el hígado, ya que el fruto de PPL posee un alto contenido de carbohidratos. Contrariamente, tal como se refleja en el análisis estadístico, las diferencias de peso en hígado no son significativas.

Al ver el gráfico de medias marginales estimadas para peso de riñón (Figura 6) se aprecia que, en machos hay un mayor aumento de peso en todos los grupos, con mayor relevancia del grupo 4 (control), en comparación de las hembras, en las que en el grupo de 30 mg./kg. es mayor respecto de los demás grupos. De otra parte, los grupos 2 y 3 en machos y hembras muestran los menores pesos; de cuyos datos se puede inferir que, a las

dosis de 300 y 500 mg./kg. de EEL del fruto de PPL, se obtiene un efecto sobre el riñón de los ratones hembras y machos, tal como indican las tablas 10 y 11; pero, al evaluar el peso/dosis/tiempo/sexo en la Tabla 12, estadísticamente, no fue significativo. Al evaluar las medias marginales estimadas para el peso del corazón, el grupo 2 de 300 mg./kg. de EEL de PPL mostró tener los menores pesos, seguido al grupo control. Asimismo, en los órganos anteriormente mencionados, las diferencias de peso a la luz de la evaluación estadística no han sido significativas. Después de todo este análisis macroscópico y estadístico de los órganos designado para tal fin podemos concluir que el EEL de PPL no promovió procesos atróficos e hipertróficos visibles en hígado, riñón y corazón de ratones hembras y machos.

En los hallazgos histopatológicos en todas las muestras histológicas se evidenció congestión y dilatación vascular; lo cual se relacionó con el tipo de exanguinado de los ratones, que fue mediante punción de la vena temporal e intracardiaca, cuya acción no facilitó un exanguinado al 100% en los ratones. Debido a ello, se produjo el efecto hallado de congestión y dilatación vascular que se observan a la lectura. Por esta razón, a la congestión y dilatación vascular se consideró como hallazgo incidental frente al estudio, y no fue tomado como daño inducido por el EEL del fruto de PPL. Del mismo modo, la elevada presentación de hepatocitos binucleados y núcleos agrandados hallados de manera similar en el grupo control, se asume que se debió a una gran actividad hepática en los roedores.

Cuando se realizó la lectura se pudo observar que tanto el grupo control como el grupo 1, no muestran lesiones visibles histológicamente en los órganos, hígado, riñón y corazón. Por tanto, se puede decir que la dosis de 30 mg./kg. en el período de 90 días no causó lesiones evidentes histológicamente en los ratones machos ni hembras. Por otro lado, el

corazón de los ratones en todas las dosis no mostró tener cambio alguno en la lectura histológica – sin lesiones visibles (SLV), ya que las fibras del miocardio mantenían su arquitectura normal, y los núcleos céntricos y sus anastomosis y bifurcaciones fueron normales. Por consiguiente, se puede decir que en el actual estudio hasta con una dosis de 500 mg./kg. de EEL de PPL no produce cardiotoxicidad en ratones machos ni hembras. A diferencia del estudio de (Perk *et al*, 2013), en el que se demostró que el fruto liofilizado de PPL tiene efecto cardiotóxico en ratas machos, determinado por el análisis de biomarcadores cardíacos en sangre, así como en el aumento de nivel de potasio en sangre. Esta lesión miocárdica producida por la isquemia-reperfusión podría ser la causante del incremento del nivel sérico del K intracelular (Kulthinee *et al*, 2010). Ello nos motiva a sugerir que, en un posterior estudio, además de hacer histopatología, se deben adicionar pruebas con marcadores cardíacos para evidenciar alguna lesión en corazón, como trabajó (Perk *et al*, 2013) al evaluar los niveles de LDH, CK-MB, TI y TT y/o cambiar de especie de estudio, de la cual se pueda tomar una mayor cantidad de muestra de sangre.

A la luz del análisis histopatológico de hígado en el grupo control, no se hallaron alteraciones; fue similar en el grupo 1 de 30 mg./kg. de EEL de PPL; mientras que no sucedió lo mismo en los grupos 2 y 3 de 300 y 500 mg./kg. de EEL de PPL; en ambos grupos, el hígado mostró lesiones compatibles con tumefacción turbia y hepatitis degenerativa vacuolar, donde el grupo 4 presentó en mayor grado. El hallazgo de tumefacción turbia y hepatitis degenerativa vacuolar es un fenómeno morfológico bien conocido que se observa en células de mamíferos después de la exposición a patógenos bacterianos o virales, así como a varios compuestos naturales y artificiales de bajo peso molecular (Shubin *et al*, 2016). Esta lesión celular es la consecuencia de la alteración en la

homeostasis de iones y fluidos, lo que produce un aumento del agua intracelular (Schrand *et al*, 2010).

Por otro lado, en el análisis histopatológico de riñón, los hallazgos tuvieron un panorama similar al de hígado, en el que los riñones del grupo control y el grupo 1 de 30 mg./kg. no mostraron lesiones visibles, debido a que mantenían su epitelio característico y la arquitectura celular. Es probable que, en esta dosis, el organismo puede aprovechar las propiedades renoprotectoras de PPL. Y recordar que la mayoría de los fitoquímicos que contiene PPL crudo tiene propiedades antioxidantes (Wu *et al*, 2009). Como en el estudio en que comprobaron que protegió de lesión renal inducida por cisplatino en la que usaron como pretratamiento PPL a dosis de 150 mg./kg. (Ahmed, 2014).

Mientras que en los riñones de los grupos 2 y 3 de 300 y 500 mg./kg. de EEL de PPL, respectivamente, se evidenció que en los túbulos se muestran células que presentan células tumefactas con vacuolas en el citoplasma más severas en el grupo 3 que en el 2. Teniendo como diagnóstico nefrosis degenerativa vacuolar del epitelio tubular renal. La vacuolización suele ser el resultado de la acumulación gradual en el tiempo de ciertas sustancias endógenas o dietéticas en las células, con la consecuente alteración de su metabolismo (Ding *et al*, 2020).

Las lesiones determinadas histopatológicamente concuerdan con los datos estadísticos encontrados; estos indican que en corazón no hay un cambio en ningún grupo; mientras que en hígado y riñón sí los hay; pero, estadísticamente, en los pesos no es significativo en ningún análisis para el caso de hígado, lo que se puede deber a las características celulares hepáticas de buena regeneración; sin embargo, la histopatología reveló la tumefacción de los hepatocitos en los grupos 2 y 3. En riñón también hay lesiones en los grupos 2 y 3, pues,

sometido al análisis de algunas pruebas estadísticas individuales –tal como muestran las tablas 10 y 11– indica que hay diferencia significativa en los pesos de riñón en los 4 grupos. Si bien, al compararlos juntos, ya dejó de ser significativo, es un indicio de que el riñón sí evidenciaba daños, y coincide con la histología.

Debido a los hallazgos ya mencionados se puede afirmar que el EEL del fruto de PPL es inocuo a la dosis de 30 mg./kg. en ratones machos y hembras en un período de administración continua de 90 días. De este modo, se puede indicar que la dosis de 30 mg./kg. del EEL del fruto de PPL vendría a ser el NOAEL (nivel sin efectos adversos observados) del estudio. Al respecto, es necesario aclarar que la dosis tóxica media en el estudio se presentó desde los 300 mg./kg. del EEL del fruto de PPL. Como evidencias se observaron efectos de toxicidad hepática y renal en ratones machos y hembras. Se trata, pues, de un proceso degenerativo reversible en cuanto se retira el agente nocivo del organismo y las células son capaces de recuperar normalidad, su funcionalidad y el estado de salud. Es importante recordar que, si no se suspende la administración de dicho agente, la degeneración vacuolar se vuelve irreversible, y lo que viene, finalmente, es la muerte celular. Por estas razones, son muy importantes estos estudios, al confirmar, científicamente, hasta qué punto ciertas sustancias son seguras y pueden ser aprovechadas sus potenciales beneficios, sin causar daños al organismo.

## CONCLUSIONES

1. Durante los 90 días de duración del estudio, los ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*, tanto hembras como machos, no evidenciaron signos compatibles con intoxicación.
2. No existió mortalidad de ratones hembras ni machos (*Mus musculus*) variedad *Swiss* en ninguno de los grupos dosificados con 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg. del fruto de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*).
3. El EEL del fruto de PPL demostró que no tiene un efecto sobre los pesos de los ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*, durante las 13 semanas de estudio.
4. Macroscópicamente, los órganos de los ratones (*Mus musculus*) variedad *Swiss*, hígado, riñón y corazón de hembras y machos, no mostraron alteraciones anatómicas aparentes. Sin embargo, microscópicamente los órganos hígado y riñón evidenciaron tumefacción celular, hepatitis degenerativa vacuolar y nefrosis degenerativa vacuolar del epitelio tubular renal, en los grupos dosificados con 300 mg./kg. y 500 mg./kg. del fruto de aguaymanto (*Physalis peruviana L.*); mientras que el corazón, en ninguno de los grupos evidenció lesiones visibles compatibles con intoxicación.

## RECOMENDACIONES

Se sugiere llevar a efecto estudios más detallados para determinar en qué momento de los 90 días se da el inicio a las lesiones de tumefacción celular en hígado y riñón.

Se debe tomar en cuenta el análisis de sangre para el estudio de marcadores cardíacos, a fin de poder evidenciar cambios que indiquen alguna lesión en el trabajo de investigación.

Se recomienda efectuar experimentos con animales más grandes, a efectos de que puedan proporcionar mayor facilidad para la toma de muestras sanguíneas.

Se podría tomar en consideración una futura investigación, a efectos de determinar en qué dosis del rango entre 30 mg./kg. y 300 mg./kg. de EEL del fruto de PPL en el período de 90 días, se evidencian lesiones de toxicidad hepática y renal en ratones *Mus musculus* variedad *Swiss*.

Se recomienda realizar un estudio usando las dosis de 300 mg./kg. y 500 mg./kg. de EEP del fruto de PPL para determinar la concentración letal, determinando el tiempo letal (TL) y el tiempo letal medio (TLM).

## LISTA DE REFERENCIAS

Ahmed, L. A. (2014) *Renoprotective effect of Egyptian cape gooseberry fruit (Physalis peruviana L.) against acute renal injury in rats*, The Scientific World Journal, 2014, pp. 1-7. doi:10.1155/2014/273870.

Al-Afifi, N. A., Alabsi, A. M., Bakri, M. M. y Ramanathan, A. (2018) *Acute and sub-acute oral toxicity of Dracaena cinnabari resin methanol extract in rats*, BMC Complementary and Alternative Medicine. BMC Complementary and Alternative Medicine, 18(1), pp. 1-14. doi:10.1186/s12906-018-2110-3.

Alonso-Castro, A. J., Domínguez, F., Ruiz-Padilla, A. J., Campos-Xolalpa, N., Zapata-Morales, J. R., Carranza-Alvarez, C. y Maldonado-Miranda, J. J. (2017) *Medicinal Plants from North and Central America and the Caribbean Considered Toxic for Humans: The Other Side of the Coin*, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2017(c). doi:10.1155/2017/9439868.

Arun, M. y Asha, V. V. (2007) *Preliminary studies on antihepatotoxic effect of Physalis peruviana Linn. (Solanaceae) against carbon tetrachloride induced acute liver injury in rats*, Journal of Ethnopharmacology, 111(1), pp. 110-114. doi:10.1016/j.jep.2006.10.038.

Bussmann, R. W., Glenn, A., Meyer, K., Kuhlman, A. y Townesmith, A. (2010) *Herbal mixtures in traditional medicine in Northern Peru*, Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 6, pp. 1-11. doi:10.1186/1746-4269-6-10.

DeFilipps, R. y Krupnick, G. (2018) *The medicinal plants of Myanmar*, PhytoKeys, 102, pp. 1-341. doi:10.3897/phytokeys.102.24380.

Deng, G., Wang, J., Zhang, Q., He, H., Wu, F., Feng, T., Zhou, J., Zou, K. y Hattori, M. (2012) *Hepatoprotective effects of phloridzin on hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride against oxidative stress-triggered damage and fibrosis in rats*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 35(7), pp. 1118-1125. doi:10.1248/bpb.b12-00057.

Diaz, C., Gonzales, E., Gavidia, J. y Venegas, E. (2018) *Fitoconstituyentes presentes en el macerado de fruto fresco Physalis peruviana «aguaymanto» con pisco*. Universidad Nacional de Trujillo. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/11056950.pdf>.

Ding, L., Li, L., Liu, S., Bao, X., Dickman, K. G., Sell, S. S., Mei, C., Zhang, Q. Y., Gu, J. y Ding, X. (2020) *Proximal tubular vacuolization and hypersensitivity to drug-induced nephrotoxicity in male mice with decreased expression of the NADPH-Cytochrome P450 reductase*, Toxicological Sciences, 173(2), pp. 362-372. doi:10.1093/toxsci/kfz225.

Fischer, G., Almanza-merchán, P. J. y Miranda, D. (2014) *Importancia y cultivo de la Uchuva ( Physalis peruviana L .) 1*, Revista Brasileña De Frutas, 36(1), pp. 1-15. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452014000100003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000100003).

Giraldo, H., Diaz, L., Delgado, L., Valero, M. y Cález, G. (2017) *Cytotoxic and Immunomodulatory Potential Activity of Physalis peruviana Fruit Extracts on Cervical Cancer (HeLa) and Fibroblast (L929) Cells*, Journal of Evidence-Based Complementary

and Alternative Medicine, 22(4), pp. 777-787. doi:10.1177/2156587217718751.

Iberico, G. (2019) Constancia de tipificación botánica. Cajamarca - Perú.

Ilmie, M. U., Jaafar, H., Mansor, S. M. y Abdullah, J. M. (2015) *Subchronic toxicity study of standardized methanolic extract of mitragyna speciosa korth in sprague-dawley rats*, Frontiers in Neuroscience, 9 (MAY), pp. 1-6. doi:10.3389/fnins.2015.00189.

INS (2008) *GUÍA DE MANEJO Y CUIDADO DE ANIMALES DE LABORATORIO : RATÓN*. Lima, pp. 2-54. Disponible en:

[http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962\\_INS68.pdf](http://bvs.minsa.gob.pe/local/INS/962_INS68.pdf).

Kasali, F. M., Kadima, J. N., Mpiana, P. T., Ngbolua, K. te N. y Tshibangu, D. S. T. (2013) *Assessment of antidiabetic activity and acute toxicity of leaf extracts from Physalis peruviana L. in guinea-pig*, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 3(11), pp. 841-846. doi:10.1016/S2221-1691(13)60166-5.

Kulthinee, S., Wyss, J. M., Jirakulsomchok, D. y Roysommuti, S. (2010) *High sugar intake exacerbates cardiac reperfusion injury in perinatal taurine depleted adult rats*, Journal of Biomedical Science, 17(SUPPL. 1), pp. 1-7. doi:10.1186/1423-0127-17-S1-S22.

Lee, M. Y., Shin, I. S., Seo, C. S., Kim, J. H., Han, S. R. y Shin, H. K. (2012) *Subchronic oral toxicity studies of the traditional herbal formula Bangpungdongseong-san in Crl: CD (SD) rats*, Journal of Ethnopharmacology. Elsevier, 144(3), pp. 720-725. doi:10.1016/j.jep.2012.10.019.

Licodiedoff, S., Koslowski, L. A. D. y Ribani, R. H. (2013) *Flavonols and antioxidant activity of Physalis peruviana L. fruit at two maturity stages*, Acta Scientiarum. Technology, 35(2). doi:10.4025/actascitechnol.v35i2.13265.

Llumiguano, L. (2014) *Evaluación del efecto hipoglicemiante del extracto de hojas de Chapuca o Uvilla Solvestre (Physalis peruviana L.) en ratas (Rattus norvegicus) con hiperglicemia inducida*. Escuela Superios Politécnica de Chimborazo. Disponible en: [http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3810/1/56T00493\\_UDCTFC.pdf](http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3810/1/56T00493_UDCTFC.pdf).

López, B., Pita, S., Pértega, S. y Seoane, T. (2019) *Comparación de dos medias, Fisterra*. Coruña, España. Disponible en: <https://www.fisterra.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras2.asp#proporcion%0A>.

Martínez, S., Conzáles, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. (2002) *Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes*. España. Disponible en: <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3338.pdf>.

Medina, D. P. (2012) *Implementación de una metodología para la obtención de marcadores de frutos de Physalis Peruviana L. y evaluación de actividad hióglicemiante*. Universidad Nacional de Colombia.

Medina, J. R. y Aviña, G. N. (2014) *Revisión de flavonoides identificados en el género Physalis ( Solanaceae ), su capacidad antioxidante e importancia como marcadores químicos . Flavonoids identified from Physalis gender ( Solanaceae ), its antioxidant capacity and importance as chemical m, Naturaleza y desarrollo*. México. Disponible en:

[https://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx.revista/files/pdf/vol12num1/nyd\\_vol12\\_num1\\_2014\\_art2.pdf](https://www.ciidiroaxaca.ipn.mx/revista/sites/www.ciidiroaxaca.ipn.mx.revista/files/pdf/vol12num1/nyd_vol12_num1_2014_art2.pdf).

Moreno, D. A. (2014) *Uchuva Physalis peruviana L. fruta andina para el mundo*. 1ra. ed. Editado por C. Catarina Pedro Pássaro Carvalho, Ph.D. Corpoica. Valencia: Diego A. Moreno, Ph.D. CEBAS-CSIC, España Comité. Disponible en:

[http://redcornucopia.org/uploads/formacion/Documentos/12/140620837217Physalis peruviana L. Futa Andina para el Mundo.pdf](http://redcornucopia.org/uploads/formacion/Documentos/12/140620837217Physalis%20peruviana%20L.%20Futa%20Andina%20para%20el%20Mundo.pdf).

Mota, F. V., Gonçalves, C. L., Schuch, L. F. D., Coimbra, H. S. y Hartwig, C. (2011) *Comparación de distintas extracciones hidroalcohólicas de plantas con indicativo etnográfico antiséptico/desinfectante*, Revista Cubana de Plantas Medicinales, 16(3), pp. 236-243. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962011000300003](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000300003).

OCDE (2018) *Guideline for the testing of chemicals*, pp. 1-13. Disponible en: [https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents\\_9789264070707-en#page1](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070707-en#page1).

Othman, M. S., Nada, A., Zaki, H. S. y Abdel Moneim, A. E. (2014) *Effect of Physalis peruviana L. on cadmium-induced testicular toxicity in rats*, Biological Trace Element Research, 159(1-3), pp. 278-287. doi:10.1007/s12011-014-9955-1.

Perk, B. O., Ilgin, S., Atli, O., Duymus, H. G. y Sirmagul, B. (2013) *Acute and Subchronic Toxic Effects of the Fruits of Physalis peruviana L., Evidence-Based Complementary and*

*Alternative Medicine*, 2013(1), pp. 1-10. Disponible en:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3863561/>.

Pinto, M. D. S., Ranilla, L. G., Apostolidis, E., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. y Shetty, K. (2009) *Evaluation of Antihyperglycemia and Antihypertension Potential of Native Peruvian Fruits Using In Vitro Models*, *Journal of Medicinal Food*, 12(2), pp. 278-291. doi:10.1089/jmf.2008.0113.

Puente, L. A., Pinto-Muñoz, C. A., Castro, E. S. y Cortés, M. (2011) *Physalis peruviana Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review*, *Food Research International*. Elsevier Ltd, 44(7), pp. 1733-1740. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.034.

Ramírez, J. (2006) *Liofilización de alimentos*, ReCiTeIA. Cali - Colombia, 1(June), pp. 2-23. Disponible en:

[https://www.researchgate.net/publication/259620189\\_Liofilizacion\\_de\\_alimentos](https://www.researchgate.net/publication/259620189_Liofilizacion_de_alimentos).

Remy, U. G., Bürkle, H. B. A. y Landsiedel, G. H. D. R. (2015) *Toxicology : a discipline in need of academic anchoring — the point of view of the German Society of Toxicology*, *Archives of Toxicology*. Springer Berlin Heidelberg, 89(10), pp. 1881-1893. doi:10.1007/s00204-015-1577-7.

Rey, D. P. (2015) *Evaluación in vitro del efecto de un extracto de frutos de Physalis peruviana sobre algunas carbohidrasas intestinales*, *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm*, 44(1), pp. 27-89. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/58053/1/1014182296.2014.pdf>.

Rey, D. P., Ospina, L. F. y Aragón, D. M. (2015) *Inhibitory effects of an extract of fruits of Physalis peruviana on some intestinal carbohydrases*, Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 44(1), pp. 72-89. doi:10.15446/rcciquifa.v44n1.54281.

Romero, R., Reyna, G., Barrantes, R. y Campos, J. (2018) *Toxicidad oral aguda del extracto etanólico del fruto de Aguaymanto liofilizado (Physalis peruviana L,l en Ratones (Mus musculus)*. Universida Nacional de Cajamarca.

Schrand, A. M., Rahman, M. F., Hussain, S. M., Schlager, J. J., Smith, D. A. y Syed, A. F. (2010) *Metal-based nanoparticles and their toxicity assessment*, Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2(5), pp. 544-568. doi:10.1002/wnan.103.

SENAMHI (2018) *Datos Meteorológicos e Hidrológicos de Cajamarca-Map A. Weberbauer*. Cajamarca. Disponible en: <https://www.senamhi.gob.pe/>.

Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M. y Kostrov, S. V. (2016) *Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival*, Oncotarget, 7(34), pp. 55863-55889. doi:10.18632/oncotarget.10150.

White, P. T., Subramanian, C., Motiwala, H. F. y Cohen, M. S. (2016) *Natural withanolides in the treatment of chronic diseases*, Advances in Experimental Medicine and Biology. doi:10.1007/978-3-319-41334-1\_14.

Wu, S. J., Chang, S. P., Lin, D. L., Wang, S. S., Hou, F. F. y Ng, L. T. (2009) *Supercritical carbon dioxide extract of Physalis peruviana induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells*, Food and Chemical Toxicology. Elsevier Ltd, 47(6), pp. 1132-1138. doi:10.1016/j.fct.2009.01.044.

Wu, S., Ng, L., Lind, D., Huang, S., Wang, S. y Lin, C. (2004) *Physalis peruviana extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway*, Cancer Letters, 215(2), pp. 199-208. doi:10.1016/j.canlet.2004.05.001.

Yıldız, G., İzli, N., Ünal, H. y Uylaşer, V. (2015) *Physical and chemical characteristics of goldenberry fruit (Physalis peruviana L.)*, Journal of Food Science and Technology, 52(4), pp. 2320-2327. doi:10.1007/s13197-014-1280-3.

Yu-Hsuan Lan, Chang, F.-R., Pan, M.-J., Wu, C.-C., Wu, S.-J., Chen, S.-L., Wang, S.-S., Wu, M.-J. y Wu, Y.-C. (2009) *New cytotoxic withanolides from Physalis peruviana*, Food Chemistry. Elsevier Ltd, 116(2), pp. 462-469. doi:10.1016/j.foodchem.2009.02.061.

Zavala, D., Quispe, A., Posso, M., Rojas, J. y Vaisberg, A. (2006) *Efecto citotóxico de Physalis peruviana en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica*, Anales de la Facultad de Medicina, 67(4), pp. 283-289. doi:10.15381/anales.v67i4.1309.

Zhao, Z. y Moghadasian, M. H. (2008) *Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review*, Food Chemistry, 109(4), pp. 691-702. doi:10.1016/j.foodchem.2008.02.039.

## APÉNDICE

**APÉNDICE 1:** Cálculo de tamaño muestral utilizando comparación de dos medias.

### COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS (Se pretende comparar si las medias son diferentes)

Indique número del tipo de test	
Tipo de test (unilateral o bilateral)	1 UNILATERAL
Nivel de confianza o seguridad (1- $\alpha$ )	95%
Poder estadístico	90%
Precisión (d) (Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar, datos cuantitativos)	24.00
Varianza ( $S^2$ ) (De la variable cuantitativa que tiene el grupo control o de referencia)	256.00
<b>TAMAÑO MUESTRAL (n)</b>	<b>8</b>

Fuente: (López *et al*, 2019)

## APÉNDICE 2: Constancia de identificación taxonómica

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ÁREA DE BOTÁNICA  
**HERBARIO CPUN "ISIDORO SÁNCHEZ VEGA-UNC"**  
herbariocpunisv@gmail.com

**Universidad Nacional de Cajamarca**  
"Escuela de la Universidad Peruana"

### CONSTANCIA

El que suscribe:

Director del Herbario CPUN "Isidoro Sánchez Vega-UNC", de la Universidad Nacional de Cajamarca, hace constar, que de parte de **JÉSSICA DEL PILAR BARRANTES NAVARRO**, Médico Veterinario y maestrante en Ciencias Veterinarias, Mención en Salud Animal, de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca; ha recibido una muestra botánica, las misma que fue identificada y ubicada taxonómicamente, en esta dependencia, como:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	Physalis
Especie	<b><i>Physalis peruviana</i> L.</b>

La especie es conocida en el medio como "tomatillo", "aguaymanto", "tomatillo de bolsa" y otros, fue colectada en el lugar llamado La Tranca Uno, distrito de Jesús, provincia de Cajamarca, departamento de Cajamarca a 3,286 msnm, en las coordenadas UTM siguientes: 792506.208 E 9191395.591 N.

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

Cajamarca, 28 de agosto de 2019

  
M.Sc. Gustavo Iberico Vela  
DIRECTOR



 Scanned with CamScanner  
Atahualpa 1050 Ciudad Universitaria, Edificio 1D-204 - Cajamarca

### APÉNDICE 3: Preparación y dosificación del EEL

Los cálculos y las dosis se calcularon semanalmente durante las 13 semanas, puesto que los datos tenían que ser modificados por la ganancia de peso vivo de cada ratón en el transcurso de cada semana. Para iniciar se debe tener el promedio de peso por grupo; en este caso, 33 g., 32 g. y 32 g. para las dosis de 30 mg./kg., 300 mg./kg. y 500 mg./kg., respectivamente.

#### 2.1. Cantidad de liofilizado por dosis

- 30 mg./kg.

$$\begin{array}{r} 30,00 \text{ mg.} \text{ ----- } 1\ 000 \text{ g.} \\ 0,99 \text{ mg.} \text{ ----- } 33 \text{ g.} \end{array}$$

$$5 \text{ hembras} + 5 \text{ machos} = 10 \text{ ratones}$$

$$0,99 \text{ mg./ratón} \times 10 \text{ ratones} = 9,9 \text{ mg./día} \times 90 \text{ días} = 891,00 \text{ mg.} \rightarrow 0,89 \text{ g.}$$

- 300 mg./kg.

$$\begin{array}{r} 300,00 \text{ mg.} \text{ ----- } 1\ 000 \text{ g.} \\ 9,60 \text{ mg.} \text{ ----- } 32 \text{ g.} \end{array}$$

$$5 \text{ hembras} + 5 \text{ machos} = 10 \text{ ratones}$$

$$9,60 \text{ mg./ratón} \times 10 \text{ ratones} = 96,00 \text{ mg./día} \times 90 \text{ días} = 8\ 640,00 \text{ mg.} \rightarrow 8,64 \text{ g.}$$

- 500 mg./kg.

$$\begin{array}{r} 500,00 \text{ mg.} \text{ ----- } 1\ 000 \text{ g.} \\ 16 \text{ mg.} \text{ ----- } 32 \text{ g.} \end{array}$$

$$5 \text{ hembras} + 5 \text{ machos} = 10 \text{ ratones}$$

$$16,50 \text{ mg./ratón} \times 10 \text{ ratones} = 160,00 \text{ mg./día} \times 90 \text{ días} = 14\ 400,00 \text{ mg.} \rightarrow 14,40 \text{ g.}$$

Cantidad total de liofilizado = (0,89+8,64+14,4) g. = 23,93 g.  $\rightarrow$  25 g.

## 2.2. Concentración de las diluciones

$$V.O = 2 \text{ mL./100 g. peso vivo}$$

$$\begin{array}{l} 2 \text{ mL.} \quad \text{-----} \quad 100,00 \text{ g.} \\ 0,64 \text{ mL.} \quad \text{-----} \quad 32,00 \text{ g.} \end{array}$$

- 30 mg./kg.  $\rightarrow$  0,99 mg./ ratón

$$\begin{array}{l} 0,99 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 0,64 \text{ mL.} \quad (\times 10) \\ 9,90 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 6,40 \text{ mL.} \quad (\times 7) \\ 69,30 \text{ mg. liofilizado} \rightarrow 44,80 \text{ mL.} \end{array}$$

Cantidad necesaria para poder preparar en una fiola de 50 mL.

$$\begin{array}{l} 69,30 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 44,80 \text{ mL.} \\ 77,34 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 50 \text{ mL.} \rightarrow 0,08 \text{ g. en } 50 \text{ mL.} \end{array}$$

Se diluyen 0,08 g. de liofilizado con cantidad necesaria de agua destilada para preparar 50 mL. de EEL 77,34 mg./50 mL. = [1,55 mg./mL.].

- 300 mg./kg.  $\rightarrow$  9,6 mg./ ratón

$$\begin{array}{l} 9,60 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 0,64 \text{ mL.} \quad (\times 10) \\ 96,00 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 6,40 \text{ mL.} \quad (\times 7) \\ 672,00 \text{ mg. liofilizado} \rightarrow 44,80 \text{ mL.} \end{array}$$

Cantidad necesaria para poder preparar en una fiola de 50 mL.

$$\begin{array}{l} 672,00 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 44,80 \text{ mL.} \\ 750,00 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 50 \text{ mL.} \rightarrow 0,75 \text{ g. en } 50 \text{ mL.} \end{array}$$

Se diluyen 0,75 g. de liofilizado con cantidad necesaria de agua destilada para preparar 50 mL. de EEL 750,00 mg./50 mL. = [15 mg./mL.].

- 500 mg./kg.  $\rightarrow$  16 mg./ ratón

$$\begin{array}{l} 16,00 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 0,64 \text{ mL.} \quad (\times 10) \\ 160 \text{ mg.} \quad \text{-----} \quad 6,40 \text{ mL.} \quad (\times 7) \\ 1120,00 \text{ mg. liofilizado} \rightarrow 44,80 \text{ mL.} \end{array}$$

Cantidad necesaria para poder preparar en una fiola de 50 mL.

1 120,00 mg. ----- 44,80 mL.  
1 250,00 mg. ----- 50 mL. → 1,25 g. en 50 mL.

Se diluyen 1,25 g. de liofilizado con cantidad necesaria de agua destilada para preparar 50 mL. de EEL 1 250,00 mg./50 mL. = [25 mg./mL.].

### 2.3. Cálculo de dosis de EEL por ratón/día/dosis

- 30 mg./kg.

Wr = 31,74 g.

CC = [1,55 mg./mL.]

30 mg. ----- 1 000 g.  
0,95 mg. ----- 31,74 g.

1,55 mg. ----- 1 mL.  
0,95 mg. ----- 0,61 mL. diario

- 300 mg./kg.

Wr = 31,54 g.

CC = [15 mg./mL.]

300 mg. ----- 1 000 g.  
0,95 mg. ----- 31,54 g.

15 mg. ----- 1 mL.  
9,46 mg. ----- 0,63 mL. diario

- 500 mg./kg.

Wr = 31,26 g.

CC = [25 mg./mL.]

500 mg. ----- 1 000 g.  
15,63 mg. ----- 31,26 g.

25 mg. ----- 1 mL.  
15,63 mg. ----- 0,62 mL. diario

#### APÉNDICE 4: Ficha clínica por cada ratón

Título:		Toxicidad oral subcrónica			
Sustancia ensayada:			Pureza:	Vehículo:	
Espécimen:	Edad:	Sexo:	Procedencia:	Dieta:	Alojamiento:
Espécimen #:	Sustancia. ensayada: (CC.)	Dosis:	Vol. Adm.:	Fecha y hora muerte:	

## APÉNDICE 5: Evolución de los pesos

Sustancia ensayada: Extracto etanólico liofilizado de *Physalis peruviana L.*

Ratón	Peso corporal en gramos													
	Día 01	Día 07	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35	Día 42	Día 48	Día 56	Día 63	Día 70	Día 77	Día 84	Día 90
1														
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														

**APÉNDICE 6:** Registro de signos y síntomas

<b>Signos y síntomas#:</b> (X según corresponda)	30´	1h	2h	3h	4h	10h	12h	18h	24h	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	...	90 d	
<b>Alopecia</b>																							
<b>Ataxia</b>																							
<b>Apnea</b>																							
<b>Catalepsia</b>																							
<b>Convulsiones</b>																							
<b>Coma</b>																							
<b>Disnea</b>																							
<b>Diarrea</b>																							
<b>Edema de patas</b>																							
<b>Epistaxis</b>																							
<b>Lacrimación</b>																							
<b>Lesiones en la piel*</b>																							
<b>Nódulos o abscesos*</b>																							
<b>Piloerección</b>																							
<b>Ptosis palpebral</b>																							
<b>Salivación</b>																							
<b>Sangrado ocular</b>																							
<b>Sueño</b>																							
<b>Taquipnea</b>																							
<b>Temblores</b>																							

\* Indicar lugar: ..... #: Especificar inicio y término

**APÉNDICE 7:** Registro de reflejos

<b>Reflejos:</b> N: normal A: alterado	30'	1h	2h	3h	4h	10h	12h	18h	24h	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	...	90d	
Reflejo al dolor																							
Reflejo corneal																							
Reflejo de agarre																							
Refl. enderezamiento																							
Reflejo de escape																							

**APÉNDICE 8:** Registro de aspectos y comportamiento

<b>Aspectos:</b> N: normal A: alterado	30'	1h	2h	3h	4h	10h	12h	18h	24h	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	...	90d
Aspecto general																								
Aspecto de la cola																								
Aspecto de los ojos																								
Aspecto de genitales																								
Aspecto de las heces																								
Aspecto de la orina																								
Caract. de la marcha																								

**APÉNDICE 9:** Registro de pesos de los órganos a la necropsia

Órgano	Grupo	
	Cód.:	vehículo
Hígado		
Riñones		
Bazo		
Corazón		
Estómago		
Pulmones		

**APÉNDICE 10:** Lesiones macroscópicas por órgano

Lesiones macroscópicas por órgano

Órgano	Grupo	
	Cód.:	vehículo
Hígado		
Riñones		
Bazo		
Corazón		
Estómago		
Pulmones		
TOTAL		

## APÉNDICE 10: Gráficos de distribución normal de ganancia de peso en ratones hembras

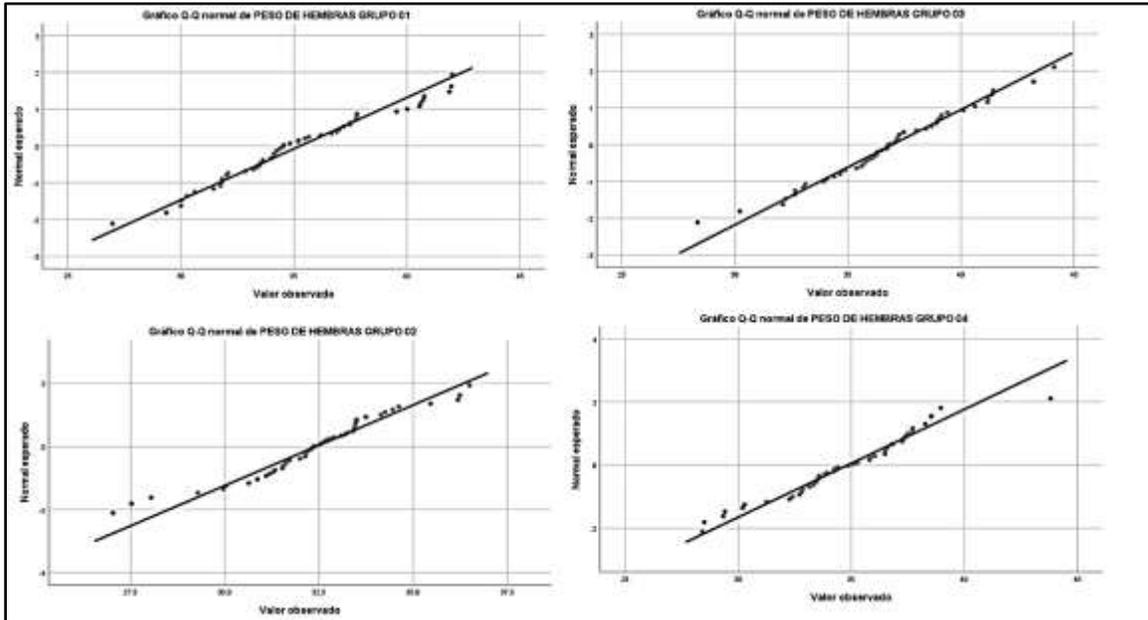


Figura 52. Distribución normal del peso de hembras mediante Q - Q.

## APÉNDICE 11: Gráficos de distribución normal de ganancia de peso en ratones machos

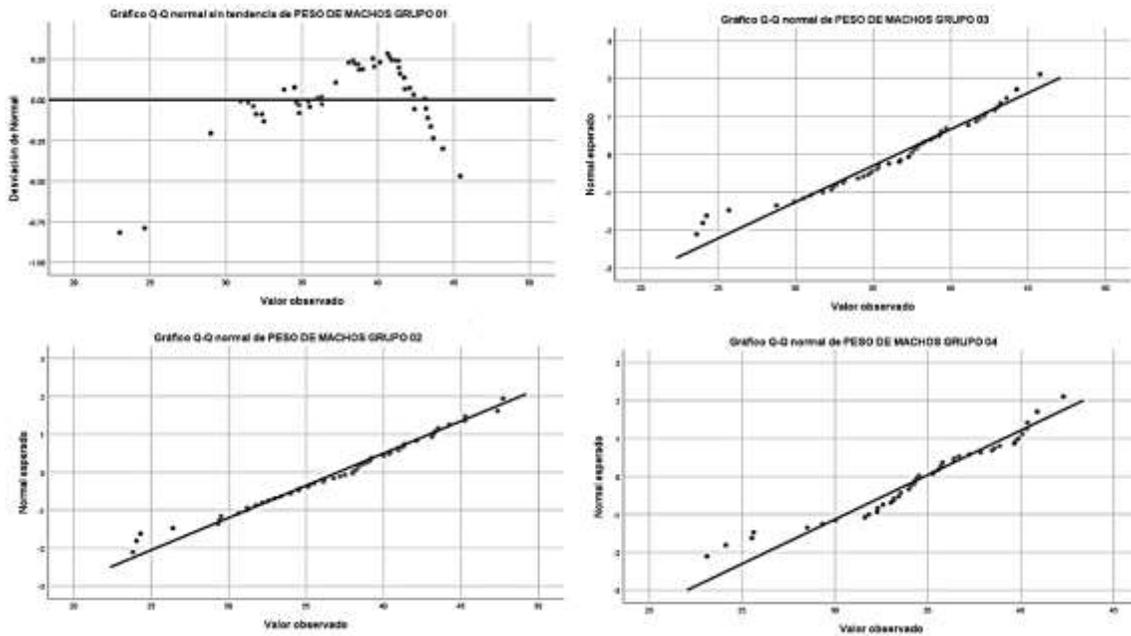


Figura 53. Distribución normal del peso en machos mediante Q - Q.

**APÉNDICE 12:** Fotos del procedimiento del trabajo



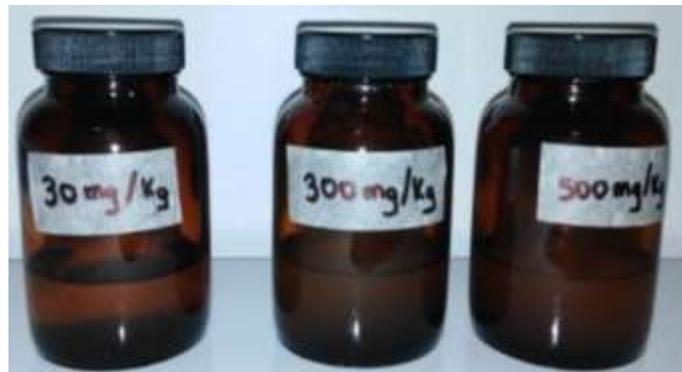
**Figura 54.** Colecta de fruto y planta para identificación botánica.



**Figura 55.** Selección y procesamiento del fruto de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto) en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo.



**Figura 56.** Ratones divididos aleatoriamente en sus respectivos grupos.



**Figura 57.** EEL de PPL en sus respectivas dosis.



**Figura 59.** Administración por sonda esofágica.



**Figura 58.** Eutanasia y disección.