

Efectos teratogénicos del extracto acuoso de *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*

Ruiz Díaz, K.^{1*}, Torres, E.², Marín, L.², Gayozo, E.²

¹Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas, Carrera Bioquímica, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.

*E-mail del autor: karenpatriciaruizdiazalmiron@gmail.com

Efectos teratogénicos del extracto acuoso de *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*. En Paraguay la planta medicinal *Maytenus ilicifolia* (Cangorosa) es muy utilizada para regular la fecundidad, purificar la sangre y tratar otras afecciones. El uso frecuente en la población es con fines abortivos, empleando las hojas para su consumo vía oral, sin embargo, existe muy poca información acerca de sus efectos sobre el desarrollo embrionario. Por esto se propuso como objetivo evaluar los efectos teratogénicos de hojas de *M. ilicifolia* sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*. Para ello se prepararon diferentes diluciones de extracto acuoso de hojas *M. ilicifolia* equivalentes a las concentraciones de consumo popular. Los embriones viables de *G. gallus domesticus* fueron expuestos, luego de 4 días de incubación, a tres concentraciones del extracto acuoso (0,0004 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 0,0038 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y 0,0382 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y a los controles (solución salina 34,35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y cafeína 0,92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), durante 10 días más. Posteriormente, se procedió a realizar la evaluación morfométrica de los embriones. Los datos obtenidos fueron analizados empleando el test de Kruskal-Wallis y el test U de Mann-Whitney, los resultados evidenciaron diferencias significativas en las dimensiones de la cabeza y del ala izquierda ($P < 0,05$), también se encontraron embriones muertos y embriones con malformaciones a las concentraciones evaluadas. Estos resultados sugieren que el extracto acuoso de *M. ilicifolia* tendría efectos sobre el desarrollo embrionario de *G. gallus domesticus* con un alto índice de embriotoxicidad y retraso en el desarrollo de los mismos.

Palabras clave: Teratígeno, embriotoxicidad, *Gallus gallus domesticus*, *Maytenus*

Teratogenic effects of *Maytenus ilicifolia* (Reissek ex Mart.) aqueous extract on the embryonic development of *Gallus gallus domesticus*. In Paraguay the medicinal plant *Maytenus ilicifolia* (Cangorosa) is widely used to regulate fertility, purify blood and treat other conditions. Frequent use in population is for abortion purposes, using the leaves for oral consumption; however, there is not enough information about its effects on embryonic development. The mainly objective was to evaluate the teratogenic effects of aqueous extract of *M. ilicifolia* leaves on *Gallus gallus domesticus* embryonic development. For this, different concentrations of the aqueous extract of *M. ilicifolia* leaves were prepared, equivalent to popular consumption. The viable embryos of *G. gallus domesticus* were exposed, after 4 days of incubation, to three concentrations of the aqueous extract (0.0004 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 0.0038 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and 0.0382 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and controls (saline 34.35 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and caffeine 0.92 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), for another 10 days. Subsequently, the morphometric evaluation of the embryos was carried out. The data obtained was analyzed using the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney U test, results showed significant differences in the dimensions of the head and left wing ($P < 0.05$), dead embryos were also found at the evaluated concentrations. These results suggest that the aqueous extract of *M. ilicifolia* would have effects on the embryonic development of *G. gallus domesticus* with a high rate of embryotoxicity and delay in their development.

Keywords: Teratogenic effects, embryotoxicity, *Gallus gallus domesticus*, *Maytenus*

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales son de uso muy común en toda Sudamérica, se siguen utilizando en varios países, tanto en poblaciones ancestrales como en culturas actuales (Huamantupa *et al.*, 2011). Paraguay no escapa de estas creencias y costumbres que se transmiten de generación en generación, siendo comercializadas generalmente por el nombre común o vernáculo y consumidas oralmente en forma de infusiones, decoctos o bebidas tradicionales como el tereré o el mate, sin embargo persiste en la población la creencia de que el consumo de plantas medicinales carecen de efectos adversos para la salud, y a su vez que su consumo resulta más bien beneficioso, en desconocimiento de que las plantas presentan metabolitos secundarios que podrían presentar algún tipo de toxicidad en el organismo (Degen *et al.*, 2005).

Existen numerosas especies vegetales que son empleadas con la finalidad de regular la fertilidad o con fines abortivos directamente, sin embargo, muchas de estas especies podrían presentar efectos adversos, como ser tóxicos, genotóxicos e incluso teratogénicos (de Araújo *et al.*, 2016).

El *Maytenus ilicifolia*, más comúnmente conocido en nuestro país como Cangorosa, es una planta dioica y nativa de Brasil, Paraguay, Argentina, Bolivia y Uruguay, pertenece a la familia Celastraceae, en su mayoría son árboles o arbustos perennes (de hasta 5 metros de altura), con hojas coriáceas alternas, florecen en primavera y fructifican en verano, contienen diferentes fitoconstituyentes dependiendo del órgano vegetal, y son muy consumidos en forma de infusiones calientes (té), o como decocciones (bebidas tradicionales como el mate) para purificar la sangre, el tratamiento

de úlceras, diurético, para regular la fertilidad e inducir la menstruación, y también como abortivo (Alonso *et al.*, 2007; Pin *et al.*, 2009; Crestani *et al.*, 2009., Ibarrola & Degen, 2011).

En un trabajo realizado con ratas *Wistar* les fueron suministrados un extracto hidroacetónico de *M. ilicifolia* durante el periodo organogénico, la gestación se desarrolló normalmente y no se observaron cambios durante el desarrollo del embrión, sin embargo, posibles efectos tóxicos como resultado de la interacción del extracto de *M. ilicifolia* con los órganos implicados en la proliferación celular, así como en tejidos embrionarios, aún debían determinarse (Cunha *et al.*, 2014).

En nuestro país no existen registros científicos sobre los posibles efectos teratogénicos que podrían ocasionar el consumo de las hojas de *M. ilicifolia* en forma de infusiones durante la etapa embriogénica. A pesar de su uso popular generalizado, la información embriotoxicológica científica para esta especie vegetal (*M. ilicifolia*) sobre el rendimiento reproductivo sigue siendo limitada, es por esto que este estudio tiene como objetivo principal determinar los posibles efectos embriotóxicos y teratogénicos sobre el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal estudiado

Maytenus ilicifolia Reissek ex Mart.: Paraguay. Vivero etnobotánico-jardín de aclimatación de plantas nativas medicinales del Jardín Botánico y Zoológico de Asunción, Departamento Central; 25°14'56" S - 57°34'23" O. Material de herbario testigo: K. Ruiz Díaz, E. Gayozo y Luciano Paniagua 001 (FACEN).

Preparación del extracto acuoso de hojas de *Maytenus ilicifolia*

Se procedió al secado de las hojas de *M. ilicifolia* de manera natural que fueron puestas a temperatura ambiente ($25^{\circ}\pm 2^{\circ}$ C) evitando el contacto directo con el sol o cualquier acto que acelere dicho proceso, seguidamente se procedió a la molienda de las mismas mediante el uso de un molino manual, el tamizaje hasta obtener las partículas pulverizadas y por último se realizó el pesaje de las mismas (Hostettmann *et al.*, 2008).

Posteriormente se realizó la suspensión en agua destilada para el proceso de cocción hasta el punto de ebullición durante 5 minutos, hasta la obtención de la infusión para los tratamientos correspondientes. Luego se procedió al filtrado con ayuda de un equipo filtrador a modo de separar restos de la molienda, una vez filtrado se empleó la misma como solución stock y a través de las cuales se obtuvieron las diluciones ($0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) para los tratamientos correspondientes, estas diluciones se refrigeraron a 4° C hasta su uso (Segovia *et al.*, 2016).

Bioensayo de evaluación teratogénica con embriones de *G. gallus domesticus*

Se emplearon un total de 30 huevos fecundados, los cuales fueron verificados con ayuda de un ovoscopio, los mismos fueron pesados obteniéndose una media de 52,4 g por huevo. La limpieza de cada huevo se realizó con Etanol 70% a modo de eliminar la carga de agentes contaminantes, luego fueron transferidos a un recipiente de plástico de dimensiones 15 x 30 x 11 cm recubiertos con algodón estéril. Los huevos dispuestos equidistantes entre sí se depositaron en una incubadora (Thermo

Schaker 2502, Fanem) a temperatura constante de $38\pm 2^{\circ}$ C y humedad relativa del 30% (Bupp *et al.*, 1998).

Los huevos fueron incubados en dos fases, la primera fue por 96 horas (4 días), culminado este periodo se determinó la localización de la cámara de aire con ayuda del ovoscopio y posteriormente con una jeringa estéril se inoculó un volumen de 0,2 mL las dosis de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ del extracto de *M. ilicifolia* determinadas en base al peso promedio de los huevos según el consumo popular, como control negativo se empleó suero fisiológico $34,35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y como control positivo cafeína de $0,92 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ en las cámaras de aire. Primeramente, se emplearon 6 huevos en cada tratamiento; luego del proceso de inoculación las aberturas fueron selladas con parafina, todo el proceso fue realizado en condiciones estériles en campana de flujo laminar. Se depositaron nuevamente los huevos en la incubadora para continuar con su desarrollo por 10 días más, lo cual comprende la segunda fase de la incubación. Culminada la segunda fase de incubación, se procedió a la apertura de cada huevo, se extrajeron los embriones, se depositaron en Etanol 98° GL para su conservación y fueron pesados en una balanza de precisión 0,0001 (KERN®) (Pawlak *et al.*, 2013).

Las evaluaciones de las malformaciones fueron determinadas realizando mediciones de las longitudes del pico (superior e inferior); cabeza (laterolateral), alas (derecha e izquierda), y tarsos (derecho e izquierdo) con ayuda de un calibre de precisión de 0,005 mm. Se calculó el porcentaje de embriotoxicidad para cada concentración del extracto de *M. ilicifolia* por medio de la fórmula descrita por (R. *et al.*, 2018):

$$\% \text{ de Embriotoxicidad} = \frac{\text{Número de embriones muertos}}{\text{Número total de embriones}} \times 100$$

Análisis estadístico de datos

Los datos obtenidos fueron analizados empleando Test U de Mann-Whitney (5% de error) para determinar diferencias entre parámetros morfológicos evaluados y el test de Kruskal-Wallis, para determinar diferencias entre tratamientos (95% de confianza), para ello se empleó el software estadístico Past 4.0 (Hammer *et al.*, 2001). Los gráficos estadísticos se realizaron también con software Past 4.0 (Hammer *et al.*, 2001).

Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ - UNA) con dictamen número 509/19.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el ensayo realizado con las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *M. ilicifolia* en las determinaciones de los pesos de los embriones del tratamiento control se registró un valor promedio de 14,75±4,69 g y en el control positivo se observó un promedio de 15,63±6,39 g. En el tratamiento realizado con el extracto a una concentración de 0,0382 µg.g⁻¹ los embriones presentaron un peso medio de 22,67±12,21 g, con la concentración de 0,0038 µg.g⁻¹ se obtuvo un promedio de 18,7±15,06 g y con la concentración de 0,0004 µg.g⁻¹ se observó un promedio de 19,4±19,37 g. Sin embargo, estos no fueron significativamente diferentes ($P>0,05$) en comparación con los datos

encontrados en el control negativo (Tabla 1, Figura 1.B).

El porcentaje de embriotoxicidad hallado en los distintos tratamientos con el extracto acuoso de *M. ilicifolia*, a la concentración de 0,0004 µg.g⁻¹, 0,0038 µg.g⁻¹ y 0,0382 µg.g⁻¹ fueron del 50%, 66,67% y 50% respectivamente, observando un efecto embriotóxico significativo ($P<0,05$). Todos evidenciaron que el extracto acuoso de *M. ilicifolia* a dichas concentraciones es tóxico para los embriones de *G. gallus domesticus* expuestos, resultados similares presentaron embriones expuestos al control positivo, indicando con un 50% la toxicidad del medio siendo significativa ($P<0,05$) (Figura 1.A). Los embriones expuestos al control negativo no demostraron toxicidad alguna.

En las determinaciones de longitudes de los picos no se evidenciaron diferencias entre los distintos tratamientos ($P>0,05$), en cuanto a la longitud de picos superiores se obtuvieron en las concentraciones de 0,0004 µg.g⁻¹ de 0,35±0,07 cm, 0,0038 µg.g⁻¹ con 0,35±0,21 cm y 0,0382 µg.g⁻¹ con 0,35±0,17cm. Sin embargo, presenta una diferencia significativa ($P<0,05$) los picos inferiores hallándose una disminución en la longitud del pico con promedio de 0,48±0,06 cm en los embriones expuestos al control positivo, lo que demuestra el retraso en el crecimiento de los embriones. Para los tratamientos de 0,0382 µg.g⁻¹, 0,0038 µg.g⁻¹ y 0,0004 µg.g⁻¹ no se observaron una disminución de la longitud promedio de los picos inferiores en comparación al control negativo con promedios de 0,63±0,12 cm, 0,43±0,31 cm y 0,55±0,07 cm respectivamente (Tabla 1, Figura 2.A, B).

En relación a la longitud de la cabeza antero-posterior, se observaron diferencias

Ruiz Díaz, K. et al. Efectos teratogénicos de *Maytenus ilicifolia* en el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*

significativas ($P < 0,05$), con el control positivo se obtuvo un promedio de $1,36 \pm 0,17$ cm y a la concentración más elevada de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ el promedio fue de $1,17 \pm 0,25$ cm, con menor longitud en comparación a los datos encontrados en el control negativo. A las demás concentraciones, $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ presentaron un promedio de $1,15 \pm 0,35$ cm y $1,17 \pm 0,59$ cm respectivamente, estos resultaron ser significativamente diferentes ($P > 0,05$) en comparación con el control negativo (Tabla 1, Figura 2.C). En cuanto a la longitud de la cabeza latero-lateral en los diferentes tratamientos presentaron un promedio de $1,45 \pm 0,21$ cm para el tratamiento con la concentración de $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, con el tratamiento a la concentración de $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ los valores fueron de $1,43 \pm 0,64$ cm y para el tratamiento con la concentración de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ fue de $1,47 \pm 0,15$ cm, en todas se observó un ligero aumento en la longitud comparados al control negativo, sin embargo no fueron significativos ($P > 0,05$) (Tabla 1, Figura 2.D). Sin embargo, se observaron anomalías craneofaciales muy visibles, como reducción del cráneo, deformidad en una región de la cabeza en algunos embriones.

En las determinaciones de longitudes de las alas, el lado derecho, no registró diferencias significativas ($P > 0,05$) en los distintos tratamientos, dando un promedio de $1,5 \pm 0,42$ cm en la concentración más baja $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $1,93 \pm 1,59$ cm en la concentración de $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $1,63 \pm 0,46$ cm a la concentración de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ que corresponde a la más elevada, siempre en comparación a los datos obtenidos en el control negativo con valores promedio de $2,03 \pm 0,79$ cm (Tabla 1, Figura 3.A). En cuanto a las longitudes de las alas, lado izquierdo, el control

negativo registro un valor promedio de $2,03 \pm 0,79$ cm, en los tratamientos realizados con la concentración de $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ los embriones presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) con aumento en las longitudes con un valor promedio de $1,5 \pm 0,43$ cm y $1,63 \pm 0,52$ cm respectivamente, lo mismo se observó en embriones expuestos al control positivo. Sin embargo, a la concentración de $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ el promedio fue de $1,93 \pm 1,60$ cm lo cual no fue significativamente diferente ($P > 0,05$) comparado al control negativo (Tabla 1, Figura 3.B).

Además, se observó que los embriones tenían una ausencia parcial de las plumas en ciertas partes del ala en la dosis más elevada y morfo-anatómicamente se observaron diferencias en cuanto al tamaño de las alas, se encontró además, que los embriones de *G. gallus domesticus*, presentaron evisceración al ser expuestos a distintas dosis del extracto acuoso de *M. ilicifolia*, siendo más evidente a la dosis de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

En las distintas concentraciones del extracto se pudo observar una gran diferencia significativa ($P < 0,05$) en cuanto a la longitud del tarso derecho e izquierdo en los embriones expuestos al control positivo. En la longitud promedio del tarso derecho en el tratamiento control negativo se evidenció un valor de $2,06 \pm 2,23$ cm, mientras que los tratamientos llevados a cabo con las concentraciones de $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ presentaron valores promedios de $0,75 \pm 0,49$ cm, $0,73 \pm 0,40$ g y $0,63 \pm 0,21$ cm respectivamente, sin embargo, estos resultados no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$) en comparación con lo hallado en el control negativo (Tabla 1, Figura 3.C).

El mismo comportamiento se observó en la longitud promedio del tarso izquierdo, el tratamiento control negativo registro un valor promedio de $2,05 \pm 2,23$ cm, los embriones tratados con $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ presentaron un promedio de $0,75 \pm 0,49$ cm, y tanto la concentración de $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ como la más elevada $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ presentaron promedios de $0,77 \pm 0,45$ cm y $0,67 \pm 0,23$ cm respectivamente los cuales resultaron no ser significativos ($P > 0,05$) comparados al grupo control (Tabla 1, Figura 3.D).

Estas alteraciones concuerdan, en general, con la información consultada, donde a mayores dosis, se observó mayor frecuencia de malformaciones, además se observaron evisceraciones en las concentraciones más elevadas y ausencia parcial de las plumas en ciertas partes del ala en todas las concentraciones expuestas (Acuña *et al.*, 1997).

No obstante, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) en cuanto a los pesos de los embriones y en las longitudes de las alas, solo los tarsos presentaron diferencias, aunque en efecto, la dieta del organismo modelo empleado es importante, ya que exceso o deficiencia de minerales o vitaminas, podrían también modificar la embriogénesis. Además, debe considerarse la vía y el vehículo utilizado por la sustancia testada, ya que la distribución, metabolismo y absorción de éste, también juegan un rol importante en el desarrollo embrionario (Acuña *et al.*, 1997).

M. ilicifolia es una planta tradicionalmente utilizada en nuestro país como alterativa medicinal, es utilizada como abortivo, específicamente la parte de sus hojas como té. En otros ensayos se han reportado efectos antiulcerogénico (Ibarrola *et al.*,

2011). Sin embargo, el mecanismo de acción permanece desconocido como lo indican en otro experimento realizado con *M. ilicifolia* (Leite *et al.*, 2010). Las hojas de *M. ilicifolia* contienen mayoritariamente triterpenos glucósidos, flavonoides y derivados de catequinas, los cuales podrían ser los causantes de los efectos registrados (Itokawa *et al.*, 1991).

Además, en otro estudio llevado a cabo por Cunha *et al.* (2014) con el extracto hidroacetónico de *M. ilicifolia* para evaluar los efectos en el rendimiento reproductivo femenino y desarrollo embrionario en ratas *Wistar* no presentó alteración en comparación con el extracto acuoso de *M. ilicifolia* el cual presentó embriotoxicidad y efectos teratogénicos en el modelo empleado en este estudio.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que a todas las concentraciones del extracto acuoso de *M. ilicifolia* evaluadas, presentan embriotoxicidad y alteraciones en el desarrollo embrionario, evidenciando diferentes malformaciones, ya sea en las dimensiones de la cabeza, en las extremidades y en el tronco de los embriones de *G. gallus* empleados. La dosis de $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ resultó ser la que posee un mayor efecto adverso sobre las dimensiones antero-posterior de la cabeza y del ala izquierda, así también anomalías morfo-anatómicas como evisceraciones, reducción del tamaño de las alas y de la cabeza. Para todas las concentraciones del extracto acuoso de *M. ilicifolia* utilizadas, $0,0382 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,0038 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ y $0,0004 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, presentaron efectos embriotóxicos en el 50% de los embriones tratados, los cuales no finalizaron el desarrollo embrionario, sugiriendo que podría deberse a la acción

Ruiz Díaz, K. et al. Efectos teratogénicos de *Maytenus ilicifolia* en el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*

del extracto acuoso sobre el organismo, el tiempo de exposición y las dosis utilizadas. A fin de confirmar estos resultados, se recomienda realizar otros ensayos con metabolitos secundarios aislados según la polaridad de los mismos, y empleando otros organismos modelos como ratones (*Mus musculus*), mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) o pez cebra (*Danio rerio*) a fin de obtener mayores detalles del posible mecanismo de acción teratogénica, el principio activo que lo podría estar ocasionando y por sobre todo extrapolar dichos resultados en poblaciones humanas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acuña, H.; Silva, T.; Muñoz, T.; Lemus A. & Fuenzalida B. (1997). Efecto del ion cobre en el desarrollo embrionario de pollo (*Gallus gallus*). *Revista Chilena de Anatomía*.
- Alonso, J. & Desmarchelier C. (2007). *Maytenus ilicifolia* Martius (Congo-rosa). In *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* Vol. 6, pp. 11–22.
- Bupp S. & Shibley I. (1998). Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. *Alcohol and Alcoholism*, 33(5), 457–464. <https://doi.org/10.1093/alcalc/33.5.457>
- Crestani, S.; Rattmann, Y.; Cipriani, T.; de Souza, L.; Iacomini, M.; Kassuya, C. & da Silva, J. (2009). A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*. *Vascular Pharmacology*, 51(1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2009.02.005>
- Cunha, A.; Auharek, S.; Oliveira, R.; Siqueira, J.; Vieira, M.; Leite, V. & Portugal, L. (2014). Effects of *Maytenus ilicifolia* on reproduction and embryo-fetal development in Wistar rats. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 3711–3720. <https://doi.org/10.4238/2014.May.9.16>
- de Araújo, C.; Santiago, F.; Peixoto, M.; de Oliveira, J. & Coutinho, M. (2016). Use of medicinal plants with teratogenic and abortive effects by pregnant women in a city in northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia*, 38(3), 127–131. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1580714>
- Degen, R.; Soria, N. & Ortiz, M. (2005). Problemática de nombres comunes de plantas medicinales comercializadas en Paraguay Medicinal plants marketed in Paraguay : Problematic of folk names. *Rev. Dominguesa*, 21(1), 11–16.
- Hammer, Ø.; Harper, D. A. & Ryan, P. (2001). Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1–9.
- Hostettmann, K.; Gupta, M. P.; Marston, A. & E. Ferreira Quiroz. (2008). Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. Secretaría Ejecutiva de la Organización del Convenio Andrés Bello. Colombia. 234 pp.
- Huamantupa, I.; Cuba, M.; Urrunaga, R.; Paz, E.; Ananya, N.; Callalli, M. & Coasaca, H. (2011). Riqueza, uso y origen de plantas medicinales expandidas en los mercados de la ciudad del Cusco. *Revista Peruana de Biología*, 18(3), 283–291. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i3.439>
- Ibarrola, D. A. & Degen de Arrúa, R. L. (2011). Catálogo ilustrado de 80 plantas medicinales del Paraguay. Facultad de Ciencias Químicas-UNA y Agencia de

- Cooperación Internacional del Japón, Asunción, Paraguay.
- Itokawa, H.; Shiota, O.; Ikuta, H.; Morita, H.; Takeya, K. & Iitaka, Y. (1991). Triterpenes from *Maytenus ilicifolia*. *Phytochemistry*, 30(11), 3713–3716. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)80096-J](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)80096-J)
- Leite, J. P. V.; Braga, F. C.; Romussi, G.; Persoli, R. M.; Tabach, R.; Carlinid, E. A. & Oliveirab, A. B. (2010). Constituents from *Maytenus ilicifolia* leaves and bioguided fractionation for gastroprotective activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(2), 248–254. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000200009>
- R., E. B.; Jesubatham, P. D.; Berlin, B. G.; Viswanathan, S. & Srividya, S. (2018). Non-toxic and non teratogenic extract of *Thuja orientalis* L. inhibited angiogenesis in zebra fish and suppressed the growth of human lung cancer cell line. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 106: 699–706 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.010>
- Pawlak, K.; Dżugan, M.; Wojtysiak, D.; Lis, M. & Niedziółka, J. (2013). Effect of in ovo injection of cadmium on chicken embryo heart. *African Journal of Agricultural Research* 8(16), 1534–1539.
- Pin, A.; González, G.; Marín, G.; Céspedes, G.; Cretton, S. Christen, P. & Roguet, D. (2009). Plantas Medicinales del Jardín Botánico de Asunción. AGR Servicios Gráficos. Paraguay. p 229.
- Segovia, E.; Arrúa, R.; Barrozo, N.; Duré, R.; Nakayama, H. & Peralta, I. (2016). Evaluación de los efectos mutagénicos/antimutagénicos de *Luehea divaricata* en ratones. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 14(3), 102–106. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014\(03\)102-106](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014(03)102-106)

ANEXOS

Tabla 1: Parámetros morfológicos evaluados en embriones de *Gallus gallus domesticus* tratados con el extracto acuoso de *M. ilicifolia*.

Parámetros morfológicos	Tratamientos				
	C. Negativo	C. Positivo	0,0004 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0,0038 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	0,0382 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
PE (g)	14,75±4,69	15,63±6,39	19,4±19,37	18,7±15,06	22,67±12,21
LPS (cm)	0,57±0,19	0,32±0,02	0,35±0,07	0,35±0,21	0,35±0,17
LPI (cm)	0,60±0,15	0,48±0,06*	0,55±0,07	0,43±0,31	0,63±0,12
LCAP (cm)	1,77±0,51	1,36±0,17*	1,15±0,35	1,17±0,59	1,17±0,25*
LCLL (cm)	1,26±0,15	1,92±0,08	1,45±0,21	1,43±0,64	1,47±70,15
LAD (cm)	2,03±0,79	2,24±0,94	1,5±0,42	1,93±1,59	1,63±0,46
LAI (cm)	2,03±0,80	2,24±0,95*	1,5±0,43*	1,93±1,60	1,63±0,52*
LTD (cm)	2,06±2,23	4,20±1,09*	0,75±0,49	0,73±0,40	0,63±0,21
LTI (cm)	2,05±2,22	4,2±1,09*	0,75±0,49	0,77±0,45	0,67±0,23

PE: peso de embriones, LPS: longitud del pico superior, LPI: longitud del pico inferior, LCAP: longitud de la cabeza antero-posterior, LCLL: longitud de la cabeza latero-lateral, LDA: longitud ala derecha, LAI: longitud ala izquierda, LTD: longitud del tarso derecho y LTI: longitud del tarso izquierdo. * Significancia estadística ($P<0,05$).

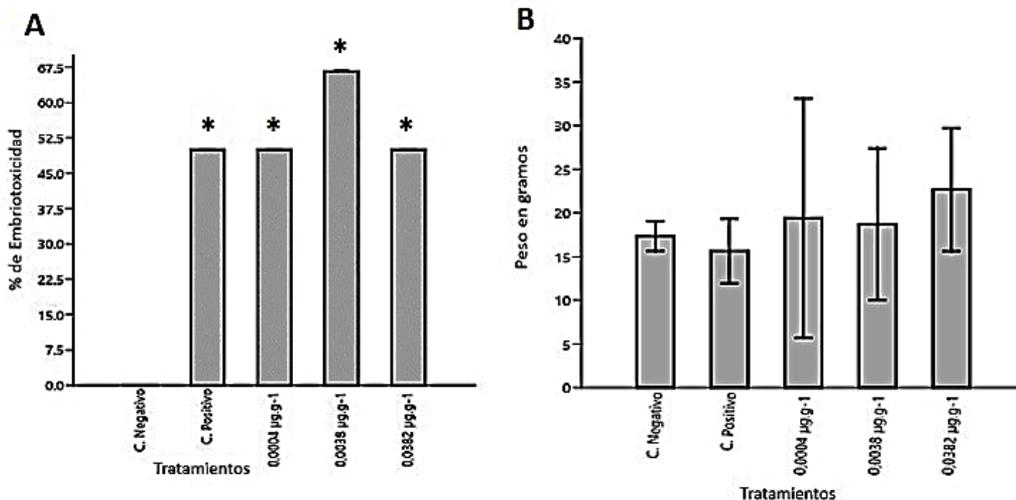


Figura 1. A. Embriotoxicidad del extracto acuoso de *M. ilicifolia* a las concentraciones evaluadas. B. Peso de los embriones de *G. gallus domesticus* expuestas a distintas concentraciones del extracto acuoso de *M. ilicifolia*. * Significancia estadística ($P<0,05$).

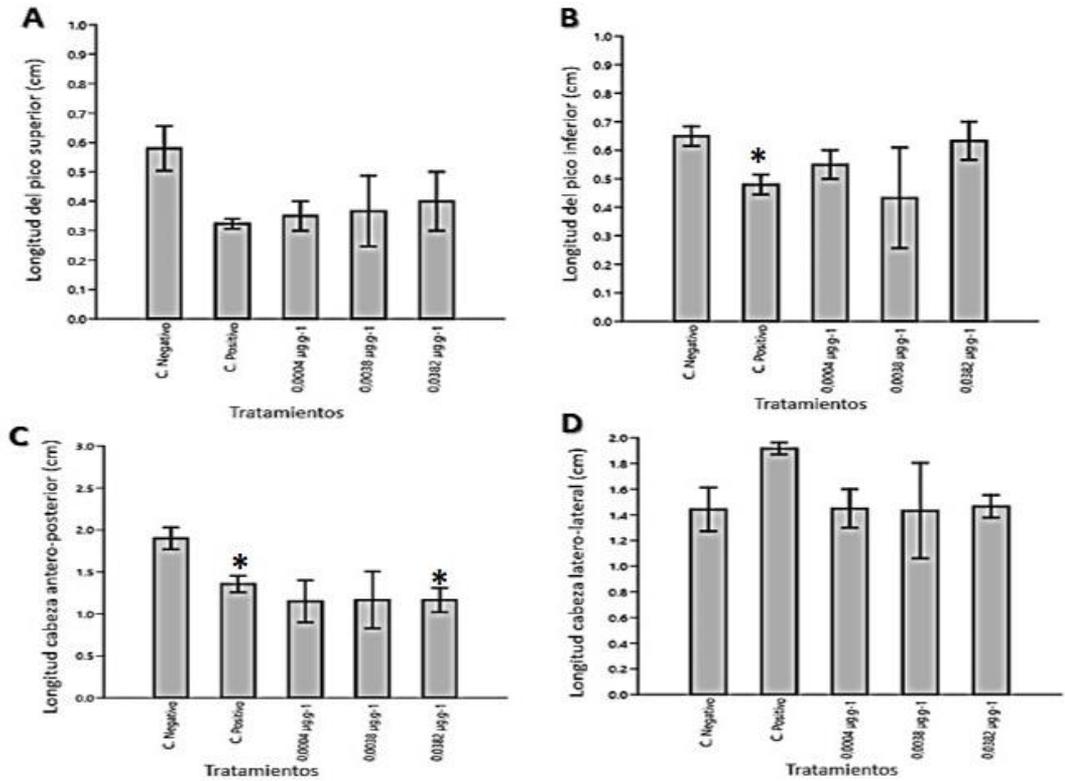


Figura 2. Parámetros morfológicos analizados en el desarrollo embrionario de *G. gallus domesticus*. **A.** Longitud del pico superior **B.** Longitud del pico inferior **C.** Longitud de la cabeza antero-posterior **D.** Longitud de la cabeza latero-lateral. * Significancia estadística ($P < 0,05$).

Ruiz Díaz, K. et al. Efectos teratogénicos de *Maytenus ilicifolia* en el desarrollo embrionario de *Gallus gallus domesticus*

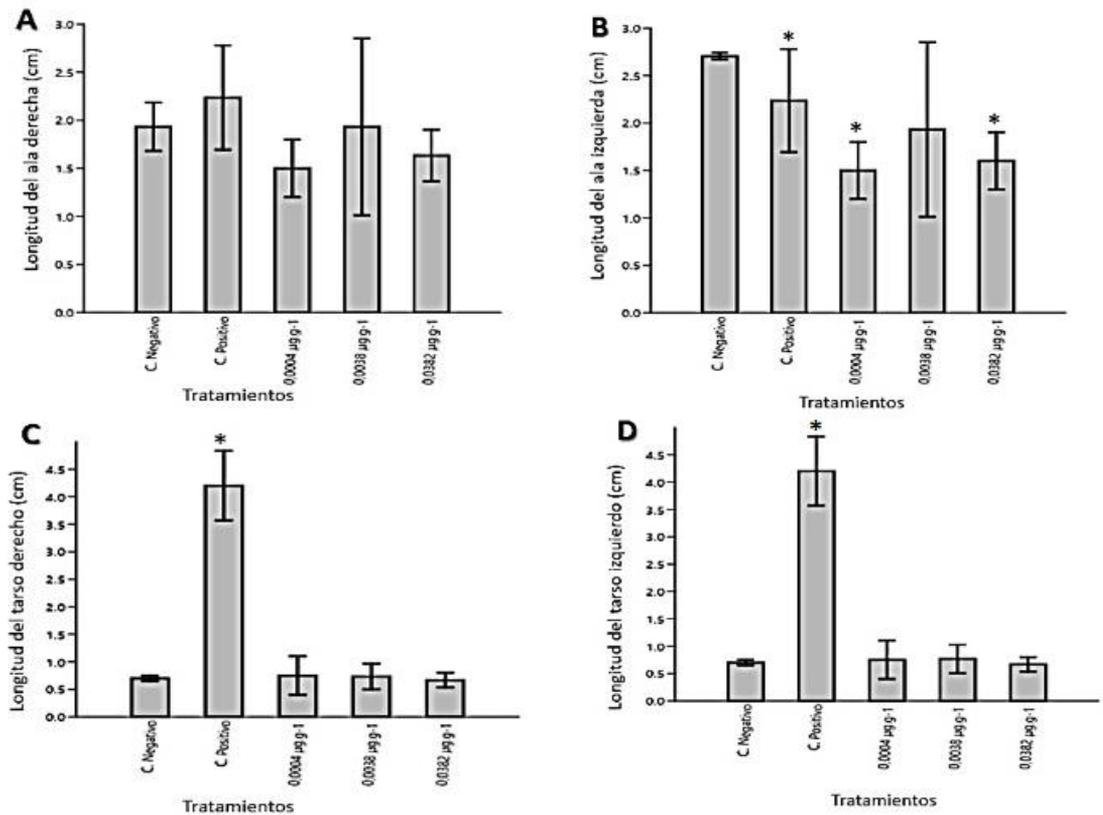


Figura 3. Parámetros morfológicos analizados en el desarrollo embrionario de *G. gallus domesticus*. **A.** Longitud ala derecha **B.** Longitud ala izquierda. **C.** Longitud tarso derecho **D.** Longitud tarso izquierdo. * Significancia estadística ($P < 0,05$).