

1990 - B

CODIGO: 083284269

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EXTRACTOS ETANOLICOS DE Sedum oxipetalum Y SU EFECTO  
SOBRE LA MOTILIDAD Y LA VIABILIDAD DE LOS  
ESPERMATOZOIDES DE HUMANO Y DE RATON.

**TESIS PROFESIONAL**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A  
MARIA DE LA PAZ RAMIREZ MUÑOZ  
GUADALAJARA, JALISCO. 1991



LABORATORIO  
BUSQUE LA PRIMAVERA  
CENTRO DE DOCUMENTACION  
E INFORMACION



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Sociedad .....

Expediente .....

Número .....

SRITA. MARIA DE LA PAZ RAMIREZ MUÑOZ  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "EXTRACTOS ETANOLICOS DE -- Sedum oxipetalum Y SUS EFECTO SOBRE LA MOTILIDAD Y LA VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDEOS DE HUMANO Y DE RATON". - - para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M. en C. Luis Huacuja Ruiz.

A T E N T A M E N T E  
"PIENSA Y TRABAJA"

Guadalajara, Jal., a 3 de Agosto de 1991  
"AÑO LIC. JOSÉ GPE. ZUNO HERNANDEZ"  
EL DIRECTOR



M. EN C. *Carlos Beas Zarate*  
CARLOS BEAS ZARATE

FACULTAD DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Vo. Bo.  
EL SECRETARIO

*Martín Fedro Tena Meza*  
M. EN C. MARTÍN FEDRO TENA MEZA

c.c.p. El Director de la Tesis Pte.-  
c.c.p. El Expediente de la Alumna Pte.-

'gpg

Al contrastar este oficio citese fecha y número

Guadalajara, Jal., Septiembre 23, 1991.

M. en C. Carlos Beas Zárate  
Director de la Facultad de Ciencias Biológicas  
de la Universidad de Guadalajara.

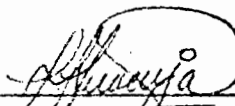
P R E S E N T E .

Por este conducto comunico a usted que la Srta. María de la Paz Ramírez Muñoz, pasante de la Lic. en Biología, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis titulado: EXTRACTOS ETANOLICOS DE *Sedum oxipetalum* Y SU EFECTO SOBRE LA MOTILIDAD Y LA VIABILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES DE HUMANO Y DE RATON, realizado en la Unidad de Investigación Biomédica de Occidente del I.M.S.S.

Así mismo le informo que he revisado el manuscrito de dicha tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos.

Sin mas por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial salud.

A T E N T A M E N T E .



---

M. en C. Luis Huacuja Ruiz.  
Director de Tesis.

" EL MISTERIO ES LA COSA  
MAS BONITA QUE PODEMOS  
EXPERIMENTAR. ES LA FUENTE  
DE TODO ARTE Y CIENCIA  
VERDADEROS. "

Albert Einstein.

(1879-1955)

~~ENCUADRE CIENTÍFICO~~

Este trabajo se realizó  
en el Laboratorio de  
Biología de la Reproducción  
en la División de  
Biología del Desarrollo de la  
Unidad de Investigación  
Biomédica de Occidente.  
(UIBO) IMSS.

Dedico el presente trabajo  
a mis padres: J. de Jesús  
y Ma. Josefina; por brin-  
darme todo su apoyo y su  
gran cariño.

" Que estas breves palabras  
cumplan su cometido al  
hacerles saber lo que  
hoy siento. "

A mi tía Victoria Muñoz de  
Fdez. y familia; por su  
apoyo y sus consejos.

A mi novio:  
Enrique F. Fanti R.  
con todo mi amor;  
por hacer que  
todo sea mejor,  
por su gran ayuda  
y apoyo invaluable  
en todos sentidos.

" Entraste en mi mundo...  
...y fuiste mi mundo. "

Al M. en C. Luis Huacuja R;  
por su apoyo, su valiosa  
ayuda y conocimientos.

A la familia Zúñiga  
Gallegos; por su con-  
fianza y apoyo incondi-  
cional.



A mi amiga: Margarita  
Santana Gómez; por su  
amistad única e incom-  
parable.

A mi hermano Chuy y  
a toda mi gran fami-  
lia.

EXTRACTOS ETANOLICOS  
DE Sedum oxipetalum  
Y SU EFECTO SOBRE LA  
MOTILIDAD Y LA VIABILIDAD  
DE LOS ESPERMATOZOIDES  
DE HUMANO Y DE RATON.

María de la Paz Ramírez Muñoz.

## INDICE

	pág.
1.- INTRODUCCION.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	5
3.- JUSTIFICACION.....	15
4.- HIPOTESIS.....	18
5.- OBJETIVO.....	20
6.- MATERIAL.....	22
7.- METODOLOGIA.....	27
8.- RESULTADOS.....	34
9.- DISCUSION.....	46
10.- CONCLUSIONES.....	49
11.- BIBLIOGRAFIA.....	52

~~INTRODUCTION~~

La terapia por medio de plantas medicinales tiene orígenes muy remotos. El primer estudio cuidadoso de las plantas fué realizado por quienes practicaban la medicina herbolaria, con una lista de plantas medicinales y sus usos desde el año 1500 A.C. (1). Actualmente el empleo de la fitoterapia se sigue practicando en casi todo el mundo, en forma de Medicina Indígena, Tradicional y Científica (2). Sin embargo, independientemente del tipo de medicina que los diferentes pueblos utilicen, la preocupación fundamental siempre será la de solucionar sus problemas en relación al binomio "salud-enfermedad". Paralelamente a esta preocupación, podría decirse que igualmente importante ha sido el hecho de como regular su crecimiento poblacional, y en este sentido, los anticonceptivos vaginales, aparentemente, son los medios mas antiguos para el control de la fertilidad: registros tomados de los antiguos egipcios, hebreos, romanos, griegos, indúes, chinos y japoneses, exponen una extensa variedad de pastas, gomas y gelatinas que aparentemente interfieren con la viabilidad y/o la motilidad de los espermatozoides dentro de la vagina. Tapones, esponjas, capas cervicales y cubiertas para el pene usados para bloquear la entrada al canal cervical, tienen también una larga historia.

A pesar de que existen diferentes y muy variados métodos y tipos de anticonceptivos, a la fecha no existe un método que ofrezca seguridad, eficiencia, reversibilidad, confiabilidad, bajo costo y sin efectos colaterales indeseables; ya que se ha encontrado que el uso de los diferentes tipos de anticonceptivos son, en mayor o menor grado, susceptibles de provocar problemas muchas veces graves, tanto para la mujer como para el niño, en caso de resultar embarazada aún utilizando anticonceptivos; el uso de anticonceptivos orales e inyectados puede provocar daños en términos de: gestación ectópica, malformaciones congénitas, mortinatos y abortos principalmente, mientras que los dispositivos intrauterinos provocan principalmente abortos, alteración en la proporción de sexos y bajo peso al nacer. Todo esto notablemente en mayor frecuencia que en otras mujeres (3). Los espermicidas vaginales pueden ocasionar malformaciones congénitas, aunque parecen tener efectos apreciables solamente en el riesgo de abortos espontáneos (4,5).

Por otra parte, la anticoncepción masculina no se ha desarrollado como debiera, de cualquier manera; también se han descrito efectos secundarios en varones vasectomizados, encontrando grandes cambios de tipo inflamatorio en el epidídi-

mo, causados por acumulación de zooides y otros productos de secreción exógena que no son reabsorbidos, dichos cambios podrían alterar la morfología y fisiología de los espermatozoides en caso de ser reversible la vasectomía por anastomosis, alterando así la fertilidad del sujeto (6). Sin embargo, mediante el uso de productos vegetales no hormonales, parece factible regular la fertilidad en el varón reduciendo efectos indeseables (7,8), el uso de estos productos y su estudio es mayor en China y en la India, donde el problema de sobrepoblación ha llegado a ser crítico (9).

( 5 )

~~ANTECEDENTES~~



En la práctica de la regulación de la fertilidad, la cultura azteca no fué la excepción; existen reportes de aproximadamente 200 especies de plantas cuyos extractos fueron utilizados como anticonceptivos, actualmente algunas de estas plantas forman parte de la medicina tradicional mexicana (10,11).

Un factor que podría resultar ventajoso por tener éxito en la anticoncepción masculina es el hecho de que el proceso espermatogénico tiene una cronología muy precisa, de tal forma que se pueden producir periodos predecibles de esterilidad por medio de la interferencia química en diferentes fases de la espermatogénesis; la duración de ésta en el hombre es de 10 a 11 semanas, con una o dos semanas adicionales para la maduración de los espermatozoides durante su tránsito por el epidídimo. Puesto que la producción y la eliminación de los espermatozoides es un proceso continuo, se requeriría un tratamiento permanente para poder mantener la esterilidad (12).

En los trabajos mas recientes realizados con plantas, para fines de anticoncepción, se han encontrado efectos variables; como la aglutinación de espermatozoides humanos, siendo el caso de Arum maculata y Arum orientale, de las

cuales se utiliza la raíz, y se ha visto que la reacción es específica hacia sustancias de la cola del espermatozoide (13). El gossypol inhibe in vitro la reacción acrosomal (14), la acrosina y proacrosina, así como la penetración del ovocito por el espermatozoide humano (15). Estudios recientes con algunos isómeros y derivados del gossypol demostraron una acción muy severa, produciendo vacuolización y degeneración sobre las mitocondrias en espermatozoides de hámsters (16).

Los estudios en humano con Phytolaca dodecandra muestran un efecto espermicida (17). Administrando crónicamente el extracto de la flor de Malvaviscus konzatti en ratas, se reduce significativamente la cuenta espermática y su motilidad (18).

Aristolochia indica Linn altera la espermatogénesis en ratón (19). Hibiscus rosa sinensis también afecta la espermatogénesis en ratas, con un efecto variable que depende de la época del año en que se colecte la planta (20,21), además de alterar el ciclo estral en ratas, con reducción del peso del ovario, útero e hipófisis (22).

Mediante el uso de preparaciones vegetales ricas en glicósidos, es factible disminuir o bloquear reversiblemente la fertilidad en el varón utilizando cantidades equivalentes a 1/3 de las empleadas clínicamente para ciertos padecimientos

del hígado, de la piel o artritis (7,8,23). También encontramos en la literatura algunos reportes sobre factibilidad anticonceptiva de algunas plantas pertenecientes a las familias Burseraceae y Crassulaceae. Dentro de la familia Burseraceae se ha estudiado a la Bursera fagaroides, cuyo extracto etanólico es rico en glicósidos (24), y tiene efecto inmovilizante-aglutinante sobre los espermatozoides de humano y de ratón (25). Este doble efecto de inmovilización-aglutinación lo produce también el extracto crudo acuoso de Echeverria gibbiflora, conocida popularmente como "oreja de burro"; de la familia Crassulaceae, la cual crece profusamente en el Valle de México y sus alrededores, y se utiliza su extracto acuoso a base de hojas maceradas, en forma de lavado vaginal post-coital, con lo que probablemente se inmovilizan y se aglutinan los espermias en la cavidad vaginal, interfiriendo de esta manera con la fertilización (26).

Si consideramos que Sedum oxipetalum es también una Crassulacea, es interesante investigar el efecto in vitro de su extracto sobre los espermatozoides, con el objeto de dilucidar si presenta factibilidad anticonceptiva.

## CARACTERISTICAS DEL SEMEN HUMANO.

El estudio del semen con fines de reproducción, tiene una limitación inherente, que consiste en que los estándares de calidad del semen se basan en los resultados de estudios de una población de varones pertenecientes a parejas fértiles. En consecuencia, los estándares son índices relativos y no absolutos de fertilidad y de esterilidad (con la única excepción de la azoospermia completa).

### C O M P O S I C I O N :

El semen es una suspensión formada por los espermatozoides y el plasma seminal; que está integrado por las secreciones de las glándulas de los diferentes órganos reproductores masculinos accesorios. Su función consiste en facilitar un medio nutritivo, de volúmen adecuado para vehicular los espermatozoos hacia el moco endocervical.

a) Los espermatozoides, que comprenden menos del 5% del volúmen del eyaculado, son normalmente el único tipo de células presentes en número apreciable en el semen normal.

b) Aproximadamente el 60% de volúmen del semen se deriva de las vesículas seminales, este líquido viscoso, neutro o li-

geramente alcalino es a menudo amarillo o incluso muy pigmentado, como resultado de su elevado contenido en flavina, que es responsable de la fluorescencia del semen a la luz ultravioleta. El semen tiene un alto contenido de fructosa, que es el principal elemento nutritivo de los espermatozoides, normalmente tiene un volumen promedio de 3.5 ml que oscila entre 1.5 y 5 ml.

c) La próstata contribuye con aproximadamente el 20% del volumen total del semen, esta secreción es rica en enzimas proteolíticas y en fosfatasa ácida, que influyen en la coagulación y licuefacción del semen.

d) Los epidídimos, conductos deferentes y otras estructuras contribuyen en menos del 15% del volumen del semen.

El análisis de la muestra debe realizarse lo antes posible, y en ningún caso después de 2 horas de su toma, no debe exponerse a temperaturas extremas y se recomienda que se recoja después de un periodo de abstinencia sexual de 3 días. El semen recién eyaculado es un material altamente viscoso, opaco, blanco o grisáceo, que puede tener un olor mohoso o acre. Media hora después de ser eyaculado, el coágulo deberá haberse licuado espontáneamente para formar un líquido translúcido y turbio, que es ligeramente alcalino con un pH de

alrededor de 7.7, Una turbiedad aumentada es el resultado de la presencia de leucocitos provenientes de un proceso inflamatorio de cualquier parte del aparato reproductor. Después de la licuefacción del semen, los espermatozoides pueden contarse en la cámara de conteo de un hemocitómetro.

e) Los rangos del recuento en un semen normal suelen ser de 60 a 150 millones de zooides/ml, con un valor promedio de alrededor de 100 millones/ml. Los valores inferiores a 20 millones/ml se consideran claramente anormales.

f) Debido a que los espermatozoides deben penetrar el moco cervical y a continuación emigrar para fertilizar al óvulo en la Trompa de Falopio, deben tener una motilidad activa, en los estudios del semen se registra el porcentaje de espermatozoides que muestran una auténtica motilidad progresiva, se ha indicado que el semen normal contiene más del 80% de espermatozoides móviles.

g) La morfología del espermatozoide se valora registrando el porcentaje de formas anormales, en base al tamaño, forma y número de cabezas, número de colas, curvatura del cuello y formas inmaduras. El semen normal contiene alrededor de un 40% de formas anormales (27).

En el semen normal existen numerosos gránulos y glóbu-

los, que presumiblemente se originan a partir de la secreción de las células glandulares o quizá de la autólisis de las células del revestimiento epitelial de las estructuras genitales accesorias (28).

Sedum oxipetalum.

DIVISION	Magnoliophyta
CLASE	Dicotiledónea
SUBCLASE	Rosidae
ORDEN	Rosales
FAMILIA	Crassulaceae
GENERO	<u>Sedum</u>
ESPECIE	<u>oxipetalum</u>

Es un arbusto erecto, que mide entre 0.5 y 1.5 metros de altura, ramificado, con una cutícula que cubre a la corteza en forma de delgadas capas amarillentas fácilmente desprendibles, su tallo es muy grueso, sus hojas son alternas, espatuladas, emarginadas, cimas terminales multifloras. Tiene flores pequeñas. Cáliz de 5 sépalos verdes, que miden de 2 a 5 mm. Corola de 5 pétalos libres, lanceolados, de color blanco, rojizo o venoso rojizo, que miden de 4 a 8 mm de largo por 1 o 2 de ancho.

Androceo con 10 estambres, con filamentos rosados y ante-



ras rojas o amarillo-rojizas.

Gineceo con pistilos simples, con un carpelo cada uno. Ovario súpero. Tiene 5 carpelos y muchos óvulos. Los frutos son folículos membranáceos o coriáceos. Florece de Julio a Octubre. Esta planta se encuentra generalmente en zonas montañosas y lechos de lava, principalmente del Estado de México (29-31).

Solo una de cada 100 especies de Crassulaceas tiene su composición química medianamente conocida. En general, son plantas en que abunda el malato cálcico y otros malatos, así como ácido málico, lo que le da su sabor agrio. Además, contienen glicósidos y al parecer también algún alcaloide (32).

~~CONFIDENTIAL~~

Debido al crecimiento logarítmico de la población mundial, la regulación de la fertilidad humana es una preocupación seria de gran actualidad. La investigación multidisciplinaria en este contexto ha permitido el desarrollo de diferentes métodos anticonceptivos como: la práctica del ritmo (33), la interrupción del coito (34), anticoncepción a nivel vaginal (4,35) o intrauterina utilizando dispositivos inertes o bioactivos (36-38), empleo de hormonales por vía oral o inyectados (5,39) o bien métodos quirúrgicos permanentes (3,6).

No obstante a las diferentes alternativas para controlar la fertilidad, es del conocimiento general que no existe un método que sea "ideal", además de que la anticoncepción masculina no se ha desarrollado tanto como su contraparte en la mujer, sin embargo, se ha demostrado que mediante el uso de productos vegetales no hormonales, parece factible disminuir o bloquear la fertilidad en el varón reduciendo significativamente efectos indeseables (23,40). En otros casos, estos productos son compuestos potencialmente utilizables para interferir con la integridad estructural y funcional de los zooides al provocar el vaciamiento del contenido acrosomal de los gametos masculinos in vitro, y por ende, podría interferirse en la capacidad fertilizante del varón (26).

Ya que se ignora él o los mecanismos involucrados en el efecto anticonceptivo descrito empíricamente, es importante determinar el efecto de estos productos vegetales sobre los gametos masculinos en condiciones de laboratorio.



En el extracto alcohólico obtenido de Sedum oxipetalum existen compuestos que aglutinan e interfieren in vitro con la motilidad progresiva y la viabilidad de los gametos masculinos de humano y de ratón.

~~CONFIDENTIAL~~

Valoración del tipo de efecto  
así como su magnitud en la motilidad  
progresiva y la viabilidad de los  
espermatozoides eyaculados de humano  
y del epidídimo del ratón después de  
incubarlos en presencia de extractos  
etanólicos secos obtenidos de  
Sedum oxipetalum.



~~XXXXXXXXXXXX~~

**EQUIPO:**

-Balanza granataria.	OHAUS
-Balanza analítica.	CHYO JUPITER C <sub>3</sub> -200
-Rotavapor.	BUCHLER INSTRUMENTS
-Baño maría.	THELCO 188
-Bomba de vacío.	WELCH Mod:1402
-Espectrofotómetro.	COLEMAN G <sub>a</sub> <sup>20</sup> L.J. II A
-Estufa eléctrica.	CHROMALOX
-Incubadora.	FIBROSYSTEM
-Microscopio.	ZEISS
-Centrífuga.	SORVALL GLC-1
-Desmineralizador.	CRISTALAB CL-5
-Vórtex.	GENIE H 550-G
-Mufla.	THERMOLYNE F-6125 M

**INSTRUMENTAL MENOR :**

- Termómetro con escala de 0 a 100°C.
- Refrigerante.
- Columna de vidrio de 1.5 x 60 cm.
- Soporte universal.
- Cronómetro. BADENIA
- Micropipeta de 50 µl. HAMILTON
- Placas de gel de sílice. MERCK
- Cámara de Neubauer. LUMICYTE
- Pipetas Pasteur. FISHER brand
- Micropipetas y puntas. EPPENDORF
- Portaobjetos. CORNING
- Cubreobjetos. MADESA
- Tubos de ensayo. PYREX
- Tubos graduados. PYREX
- Pipeta para glóbulos blancos. INTRAMEDIC

**REACTIVOS:**

-Antrona.	SIGMA
-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	MERCK.
-Sephadex G-15.	PHARM. FINE CHEMIC.
-Azul de tripano.	SIGMA
-Orcinol.	SIGMA
-Nitrógeno(gas).	INFRA
-Solución para contar células.	LIQUIDO DE TURK. IMSS.

**SOLVENTES :**

-Hexano.	MERCK
-Etanol.	MERCK
-Butanol.	MERCK
-Acido acético.	MERCK

**MATERIAL BIOLÓGICO:**

- Semen humano.
- Ratones de la cepa BALB/c.
- Sedum oxipetalum.

**METODOLOGIA**

La recolección de la planta se realizó en el Estado de Michoacán, entre las poblaciones de Quiroga y Capula, y su identificación taxonómica se efectuó en el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara.

En el laboratorio se procedió a desprender la cutícula de la planta y a separar la corteza de la médula para extraerlos por separado, debido a la posibilidad de que tuvieran diferente actividad sus extractos respectivos.

#### EXTRACCION SELECTIVA.

Para la obtención de los extractos se utilizaron 400 gramos de la corteza y/o médula, los que fueron seccionados en fragmentos pequeños para hacer mas eficientes las extracciones.

Se realizaron varias extracciones sucesivas:

Primero con 1.2 litros de hexano normal durante 4 horas, a una temperatura de 52°C a reflujo controlado.

El residuo se reextrajo 3 veces mas, adicionando cada vez 1.2 litros de etanol 80%, a una temperatura de 60°C y a reflujo constante durante 4 horas cada vez.

Los extractos etanólicos se combinaron y se guardaron en congelación por 24 horas, para eliminar un precipitado de congelación.

Los disolventes de las extracciones se eliminaron a presión reducida y temperatura controlada para secar los extractos correspondientes (25).

En los extractos ya secos se hicieron determinaciones de carbohidratos totales con el método de Hewitt (41), el cual se basa en la reacción de los carbohidratos con el reactivo de antrona. La intensidad del color del cromóforo formada, es directamente proporcional a la cantidad de carbohidratos presentes en la muestra, tiene una longitud de onda máxima de absorción de 620 nm.

La determinación de carbohidratos totales se realizó como parámetro cuantitativo al realizar los ensayos de actividad biológica.

Todas las pruebas de actividad biológica y determinaciones de carbohidratos se realizaron a partir de una solución acuosa del extracto al 4%, para de ésta hacer las diluciones adecuadas, según las concentraciones de la curva estándar. (Gráfica 1).

Se realizó una semipurificación de los extractos etanólicos, mediante filtración, utilizando como soporte sephadex G-15 en columna de 1.5 x 45 cm.

De las soluciones de los extractos al 4% se tomaron 15 ml y se concentraron a 3 ml para aplicarlos sobre la co--



lumna para su filtración. La columna fué equilibrada con agua bidestilada y a una velocidad de flujo de 25 ml/hora. Se colectaron 100 fracciones de 1 ml cada una, y en ellas se cuantificó la concentración de carbohidratos totales por el método de la antrona; aquellas fracciones que en el perfil de filtración definieron picos, se juntaron para formar los productos de filtración correspondientes.

Todos los productos de filtración se analizaron paralelamente con el extracto total tanto de corteza como de médula, mediante cromatografía en placa fina de gel de sílice con sistema de elución para glicósidos, que consistió en: butanol; ácido acético; agua 16:4:4 (v/v) (42). Esto sirvió para analizar el grado de pureza de cada producto, aplicando 2 o 3 µl de cada una.

Se investigó el efecto de los productos de filtración sobre la motilidad de los espermatozoides, para detectar él o los productos de filtración activos.

#### SELECCION DE LAS MUESTRAS DE SEMEN.

Se utilizaron 10 muestras de semen humano, obtenidas por masturbación de sujetos fértiles y sanos clínicamente, que fueron programados para vasectomía al servicio de Andro-

logía del Hospital de Gineco-Obstetricia del Centro Médico de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social. El tiempo de abstinencia sexual previo a la adquisición de la muestra fué de por lo menos 3 días. Las muestras utilizadas en este estudio llenaron los siguientes requisitos:

- A) Licuefacción: completa después de 30 minutos.
- B) Volúmen: mayor de 2 ml.
- C) Motilidad: mayor del 60%.
- D) Viabilidad: 80%.
- E) Número de espermatozoides: mayor a 50 millones/ml.

Los espermatozoides de ratón, de la cepa BALB/c se obtuvieron de la cola del epidídimo, después de sacrificar varios animales hasta completar la cantidad necesaria. Las colas de los epidídimos se colocaron en un vaso de precipitado con solución amortiguadora Krebs Ringer-Lactato Piruvato (KR-LP) a 37°C, y fueron seccionadas finamente con tijeras de disección, la suspensión obtenida se filtró inmediatamente después en una columna elaborada con una pipeta Pasteur que contenía fibra de vidrio, para facilitar la filtración se agregó KR-LP.

Los espermatozoides; tanto de humano como del epidídimo del ratón, fueron separados del plasma seminal y/o líquido

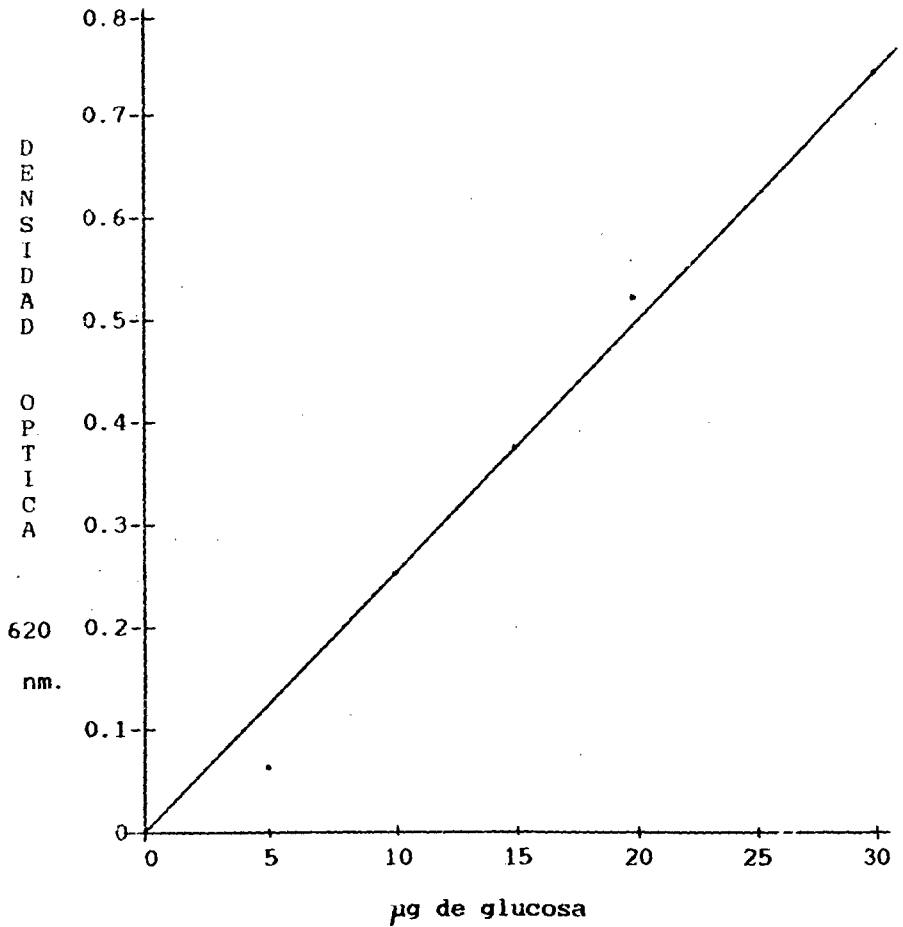
epididimario por centrifugación a 2,000 rpm durante 15 minutos y lavados dos veces con amortiguador KR-LP pH=7.3, después del segundo lavado, los espermatozoides se resuspendieron en la misma solución, se contaron y se ajustaron las suspensiones a  $20 \times 10^6$  espermatozoides de humano y/o ratón, que fueron incubados a 37°C en 0.5 ml de KR-LP para estudiar el efecto de los extractos, tanto totales como de los productos de filtración, en ausencia (controles) y en presencia de cantidades variables del extracto hasta encontrar la que provoca el 100% de inmovilización y/o aglutinación instantánea, para observar este efecto se utilizó un microscopio fotónico normal con óptica de contraste de fases.

#### VIABILIDAD.

Después de incubar los espermatozoides a 37°C a tiempos variables de 0 a 5 hrs en ausencia (controles) y presencia de dosis de aglutinación 100%, se adicionaron 2 gotas de azul de tripano 1% en KR-LP y después de 3 minutos se fijaron. Se contaron 100 células al microscopio fotónico normal para cuantificar el porcentaje de células viables (no teñidas) y el correspondiente a los espermatozoides muertos (teñidos). Posteriormente se compararon estos valores con los obtenidos en preparaciones hechas con espermatozoides incubados en ausencia (control) del extracto (43).

**GRAFICA 1.**

**CURVA PATRON PARA CUANTIFICACION DE CARBOHIDRATOS TOTALES**



~~RESULTS~~

Los resultados de la recuperación por extracción selectiva y precipitación se presentan en la Tabla 1, en la que se muestran los pesos y porcentajes relativos obtenidos en las extracciones correspondientes, observándose claramente que el extracto contiene la mayor cantidad de las sustancias extraídas de las plantas (5.9%) respecto a lo extraído con hexano (0.35%) y el precipitado de congelación (0.93%). Solamente en el extracto etanólico hubo actividad inmovilizante-aglutinante.

La filtración en columna de sephadex G-15 de los extractos de corteza y de médula, separó adecuadamente 3 productos principales (picos 1, 2 y 3), definidos por la presencia de carbohidratos totales en las fracciones colectadas, Gráfica 2.

#### ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS.

Los cambios observados en la motilidad progresiva de los espermatozoides, tanto de humano como de ratón, fueron los mismos. En la Figura 1 se puede observar el efecto de 100 % de aglutinación e inmovilización sobre los espermatozoides eyaculados de humano (A), y del epidídimo de ratón (B), y compararlos con sus controles respectivos (izquierda). Este efecto de aglutinación-inmovilización instantánea

se logró en presencia de extractos de corteza y de médula equivalentes a 232 y 215  $\mu\text{g}$  de azúcares totales respectivamente, o bien, a 26.0 y 6.4  $\mu\text{g}$  del producto de filtración activo (pico 1) de corteza y de médula, como se muestra en la Tabla 2.

La evaluación del grado de pureza de los subproductos de filtración, mostró tanto en corteza como en médula, que el subproducto o pico 1 parece estar libre de los componentes de los demás subproductos (Figura 2). El procedimiento de filtración por columna de sephadex G-15 permitió separar del subproducto activo por lo menos 6 compuestos diferentes en una fracción, que corresponde al pico 3, además del subproducto mayor o pico 2 (Gráfica 2).

Los resultados de las pruebas de viabilidad de espermatozoides de humano señalan un mayor porcentaje de viabilidad en las muestras incubadas en presencia del extracto en relación a los controles (sin extracto), como se puede ver en la Gráfica 3. Sin embargo, el tratamiento estadístico indicó que esta diferencia no es significativa (Tabla 3 A). Por otra parte, la viabilidad de los espermatozoides del epidídimo de ratón, incubados en presencia del extracto, resultó menor que en los controles, lo cual puede observarse en la

Gráfica 4. También en este caso la diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 3 B). Cada valor representa el promedio de 3 experimentos.



**TABLA 1.**  
**RECUPERACION DEL MATERIAL DE LA PLANTA**  
**POR EXTRACCION SELECTIVA Y PRECIPITACION**

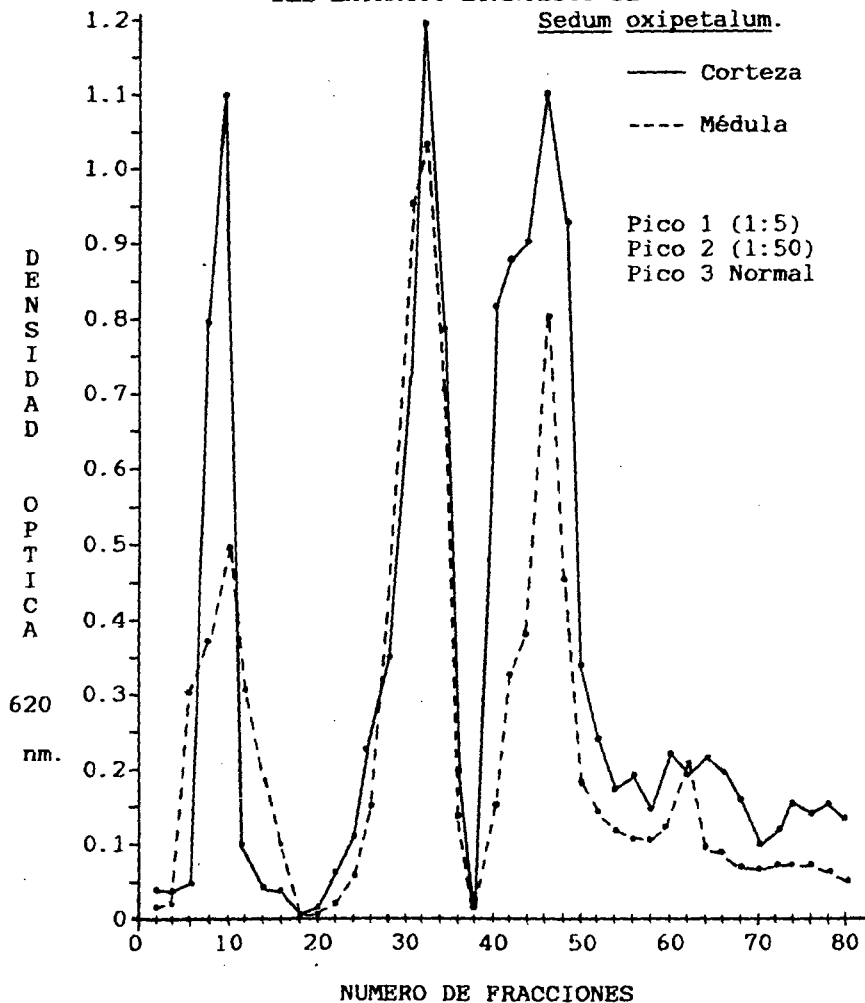
MATERIAL EXTRAIDO	CANTIDAD EN GRAMOS	RENDIMIENTO (%)
EXTRACTO 1 (con hexano)	1.40	0.35
EXTRACTO 2 (con etanol 80%)	23.35	5.90
PRECIPITADO (por congelación)	3.70	0.93

Se utilizaron 400 gramos de corteza y/o médula de la planta. Las cantidades representan valores promedio de 3 experimentos.

### GRAFICA 2.

CARBOHIDRATOS TOTALES. PERFIL DE FILTRACION  
DEL EXTRACTO ETANOLICO DE

Sedum oxipetalum.



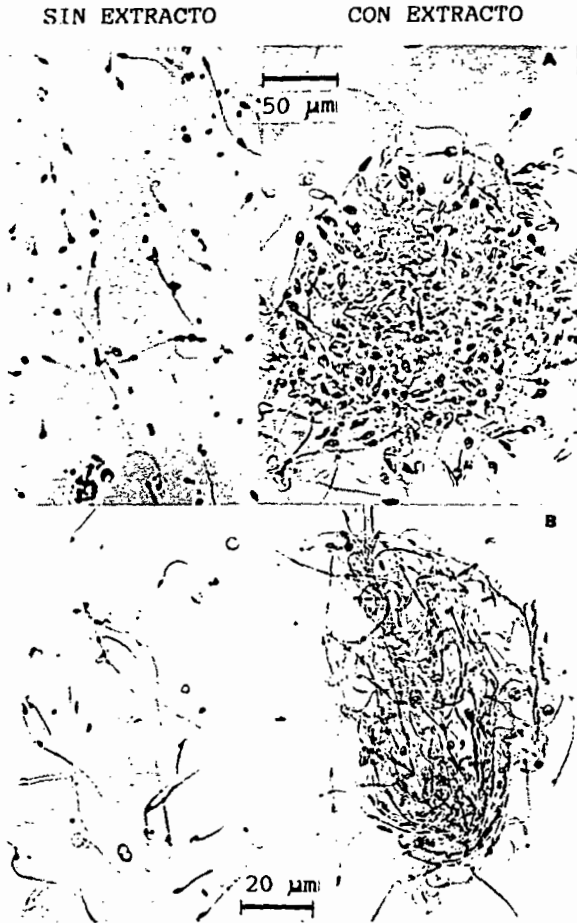


Figura 1.

A.- Espermatozoides de humano.

B.- Espermatozoides de ratón.

TABLA 2.

CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS TOTALES  
Y SEMIPURIFICADOS NECESARIAS PARA PRODUCIR  
100% DE AGLUTINACION E INMOVILIZACION INSTANTANEA

EXTRACTO	CORTEZA	MEDULA
Etanólico sin purificar	232.0	215.0
Purificado. Pico 1 de filtración.	26.0	6.4

Los valores están expresados  
en  $\mu\text{g}$  de carbohidratos totales.

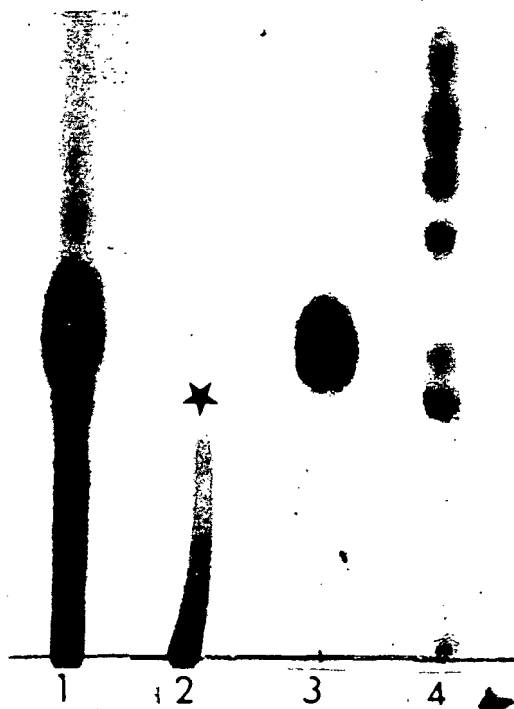


Figura 2. CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA  
EN GEL DE SILICE.

- 1.- Extracto total.
- 2.- Pico 1 de filtración.★
- 3.- Pico 2 de filtración.
- 4.- Pico 3 de filtración.

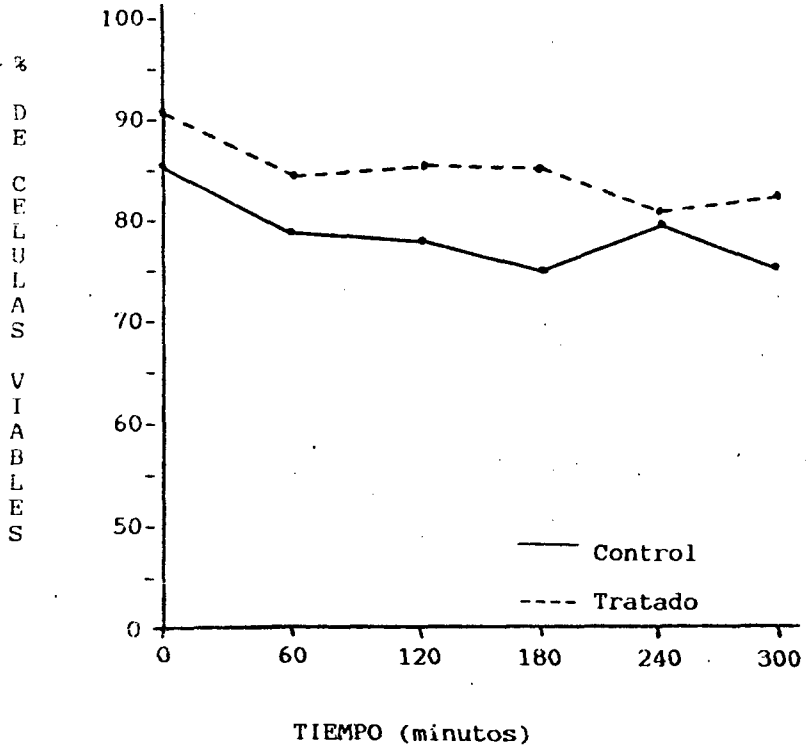
BUTANOL; ACIDO ACETICO; AGUA  
16:4:4 (v/v)

GRAFICA 3.

VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE HUMANO

INCUBADOS CON 223.9  $\mu$ g DE CARBOHIDRATOS

TOTALES DE EXTRACTO ETANOLICO DE Sedum oxipetalum



GRAFICA 4.

VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE RATON

INCUBADOS CON 223.9  $\mu\text{g}$  DE CARBOHIDRATOS

TOTALES DE EXTRACTO ETANOLICO DE Sedum oxipetalum

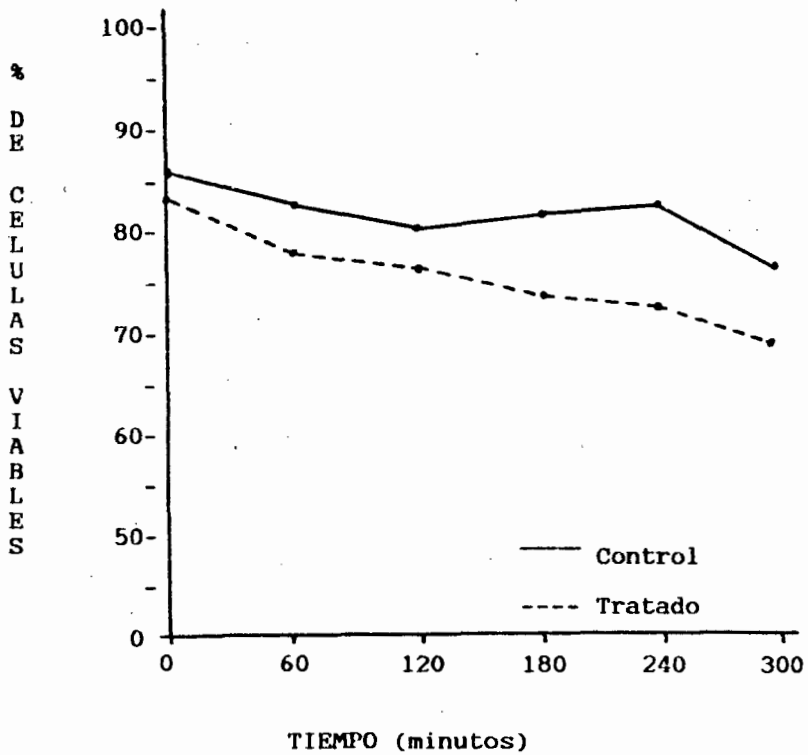


TABLA 3.

## a) VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE HUMANO

TIEMPO (hrs)	Controles		Tratados		P
	%	DS	%	DS	
0	85.2	± 2.02	90.3	± 7.02	NS
1	79.3	± 2.89	84.2	± 13.34	NS
2	79.0	± 9.00	86.2	± 10.61	NS
3	75.0	± 9.17	86.3	± 12.42	NS
4	80.3	± 8.96	81.0	± 13.08	NS
5	75.3	± 5.51	83.0	± 15.10	NS

## b) VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES DE RATON

TIEMPO (hrs)	Controles		Tratados		P
	%	DS	%	DS	
0	86.3	± 10.69	84.0	± 7.00	NS
1	83.3	± 12.50	78.7	± 7.23	NS
2	80.7	± 11.37	77.3	± 7.50	NS
3	82.7	± 12.86	74.7	± 5.69	NS
4	83.7	± 10.02	73.0	± 8.66	NS
5	77.3	± 11.24	69.3	± 8.74	NS



~~DISCUSSION~~

El efecto doble inmovilizante-aglutinante observado en los espermatozoides de humano y de ratón, fué el mismo en presencia del extracto total (Figura 1), así como en presencia del producto activo purificado por filtración, tanto de médula como de la corteza. Debido a que los perfiles de filtración de los extractos de médula y de corteza fueron muy semejantes (Gráfica 2), los experimentos de extracción en lo sucesivo se hicieron con los tallos seccionados finamente, sin separar previamente la médula de la corteza.

Los análisis por cromatografía en placa fina de los subproductos de filtración (Figura 2) mostraron claramente que la muestra 1 (extracto total) contiene una mezcla de compuestos muy compleja, en la que destacan dos compuestos principales, uno con mucha dificultad de movilidad; con un  $R_f = 0.20$  y el otro con mayor desplazamiento; con un  $R_f = 0.43$  y aparentemente el de mayor abundancia. Los números 2, 3 y 4 representan los sitios de aplicación de los subproductos de filtración o picos 1, 2 y 3 respectivamente. El subproducto 1 de filtración, que es el activo, se ve muy bien separado del subproducto o pico 2 de filtración. El subproducto 3 de filtración, que contiene por lo menos 6 compuestos, también fué completamente separado del subproducto 1 de filtración. Por

lo tanto, nuestro sistema de purificación por columna de sephadex G-15 resultó ser muy efectivo para la separación de los productos activos de la planta, contenidos en el pico 1 (Figura 2, marcado con estrella). Aunque la mayor cantidad de material colectado y separado por filtración se encontró en el pico 2, la actividad inmovilizante-aglutinante siempre e invariablemente fué encontrada en el subproducto o pico 1 de filtración.

Respecto a los resultados de las pruebas de viabilidad de los espermatozoides eyaculados de humano, se observó que el porcentaje de viabilidad resultó mayor en presencia del extracto (Gráfica 3); esto podría explicarse por la fijación del producto sobre la membrana plasmática, dificultándose por sí mismo su libre penetración al espermatozoide. Este comportamiento no fué así en los espermatozoides de ratón, en los cuales se observó una disminución de la viabilidad con respecto a la observada en los controles (Gráfica 4). Esta diferencia podría explicarse debido a que los de ratón son espermatozoides obtenidos del epidídimo, no eyaculados, o bien a una diferencia específica de especie.

~~CONCLUSIONS~~

- 1.- Los procedimientos de extracción con etanol 80% remueven la mayor cantidad de solutos de la planta, y entre ellos los que tienen actividad inmovilizante-aglutinante.
- 2.- No se encontraron diferencias; ni en la composición ni en el tipo de efecto de los extractos obtenidos de corteza o de médula.
- 3.- Mediante filtración en columna de sephadex G-15, se logró adecuada separación de 3 productos de filtración. de los cuales, solamente el primero contiene la actividad inmovilizante-aglutinante.
- 4.- La cromatografía en placa fina mostró que el producto activo de filtración está libre de los componentes de los productos 2 y 3.
- 5.- El patrón de inmovilización-aglutinación es el mismo tanto para espermatozoides eyaculados de humano o del epidídimo del ratón, utilizando la misma cantidad de extracto.
- 6.- La viabilidad; tanto de los espermatozoides de humano como de los de ratón en presencia del extracto, no fué estadísticamente diferente con respecto a la de los controles.
- 7.- El extracto no es tóxico para los espermatozoides de humano y de ratón, ya que la viabilidad no es estadística-

mente diferente a la de los controles; al menos después de 5 horas de incubación.

- 8.- Los extractos etanólicos obtenidos de Sedum oxipetalum contienen por lo menos 8 compuestos, de los cuales uno de ellos produce inmovilización y aglutinación a espermatozoides eyaculados de humano y del epidídimo del ratón.

~~XXXXXXXXXXXX~~

- 1.- Edmund W. La Ciencia de las Plantas y su Historia. Botánica principios y problemas. Ed CECSA. 2ªed. 1981; 25: 32.
- 2.- Capasso F, Balestrieri B, Macolo N. Actualidad de las Plantas Medicinales. Medicina Tradicional III. Ed Comité Editorial. 4ª ed. Méx. 1980; 10.
- 3.- Vessey M, Meisler L, Flavel R, Yeates D. Outcome of pregnancy in women using different methods of contraception. B.J.Obs Gyn. 1979; 86: 548-556.
- 4.- Huggins G, Vessey M, Flavel R, Yeates D, McPherson K. Vaginal spermicides and outcome of pregnancy: findings in a large cohort study. Contraception. 1982; 25: 219-230.
- 5.- Edgren R, Sturtevant F. Potencies of oral contraceptives Am.J.Obst Gyn. 1976; 125: 1029-1038.
- 6.- Pardanani M, Nivrutti G, Pattil M, Pawar H. Some gross observations of the epididymides following vasectomy: a clinical study. Fertil Steril. 1976; 27: 267-270.
- 7.- Qian SZ. Tripterygium wilfordii, a chinese herb effective in male fertility regulation. Contraception. 1987; 36: 335-345.



- 8.- Qian SZ, Zhong ChQ, Xu Y. Effect of Tripterygium wilfordii Hook F. on the fertility of rats. Contraception. 1986; 33: 105-110.
- 9.- Kamboj V, Dhawan B. Research on plants for fertility regulation in India. J.Ethnopharmacology. 1982; 6: 191-226
- 10.- Ortiz de M B. Empirical aztec medicine. Science. 1975; 188: 215-220.
- 11.- Pozo del, E. Aztec pharmacology. Ann.Rev.Pharm. 1966; 6: 9-18.
- 12.- Austin C, Short R. Control Artificial de la Reproducción Ed Prensa Médica Mexicana. 1982; 3: 67-85.
- 13.- Mladenov I. Agglutination of human spermatozoa with extracts from Arum maculata and Arum orientale. C.R.Acad. Sci. 1982; 8: 35.
- 14.- Qi-Xian S, Friend D. Gossypol-Induced Inhibition of Guinea Pig sperm capacitation in vitro. Biol.Rep. 1983; 29: 1027-1032.
- 15.- Kennedy W, Van der Ven H, Straus W, Bhattacharyya A, Waller D, Zaneveld L, Polakoshi K. Gossypol inhibition of acrosin and proacrosin, and oocyte penetration by human spermatozoa. Biol.Rep. 1983; 29: 999-1009.
- 16.- Hoffer A, Agarwal A, Meltzer P, Herlihy P, Naqvi R, Lindberg M, Matlin S. Ultrastructural, fertility and spermi-

- cidal studies with isomers and derivatives of gossypol in male hamsters. Biol.Rep. 1987; 37: 909-924.
- 17.- Stolzenberg S, Parkhurst R. Spermicidal actions of extracts and compounds from Phytolaca dodecandra. Contraception. 1974; 10: 135-143.
- 18.- Pakrashi A, Sanyal S, Banerjee R, Ruparel S. Effect of Malvaviscus conzatii flower extract on male fertility. Contraception. 1985; 31: 101-108.
- 19.- Pakrashi A, Pakrashi P. Antiespermatogen effect of the extract of Aristolochia indica Linn on male mice. Indian J.Exp.Biol. 1977; 15: 256-259.
- 20.- Kholkute S. Effect of Hibiscus rosa sinensis on spermatogenesis and accessory reproductive organs in rats. Planta Médica. 1977; 31: 127-135.
- 21.- Kholkute S, Mudgal V, Udupa K. Studies on the antifertility potentiality of Hibiscus rosa. Planta Médica. 1977; 35-39.
- 22.- Kholkute S, Chatterjee S, Udupa K. Effect of Hibiscus rosa sinensis Linn on oestrous cycle & reproductive organs in rats. I.J.Exp.Rep. 1976; 14: 703-704.
- 23.- Kamboj V, Setty B, Khana N. Semen coagulation a potential approach to contraception. Contraception. 1977; 15: 601-610.

- 24.- Comunicación personal: Pérez Amador MC.
- 25.- Huacuja R, Delgado N, Carranco L, Reyes L, Rosado G. Actividad aglutinante e inmovilizante del extracto etanólico de Bursera fagaroides sobre espermatozoides de humano y de otros mamíferos. Arch.Inv.Méd. (Méx). 1990; 21: en prensa.
- 26.- Huacuja R, Taboada J, Ortega A, Merchant H, Reyes R, Delgado N. Immobilization and agglutination effects of Echeveria gibbiflora crassulaceae aqueous crude extract of human spermatozoa. Adv.Contra.Del.Sys. 1985; II: 229-236.
- 27.- Pérez P. Infertilidad, esterilidad y endocrinología de la reproducción. Salvat. 1981; X: 340-341.
- 28.- Cannon D. Microscopía Médica y Estudio de otros líquidos orgánicos. Exámen del líquido seminal. Cap 21. Pp: 703-707.
- 29.- Jones S. Sistemática Vegetal. 2ª ed. Ed. McGraw-Hill.. Sistema de Clasificación de Cronquist. 1987; 14: 373-503
- 30.- Standley P. Trees and Shrubs of México. 1922; 23: 307.
- 31.- Sánchez S. La Flora del Valle de México. Ed Herrero. 1984: 184-188.

- 32.- Font Quer P. Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado. Ed Labor. 1985: 295.
- 33.- Hafez E.S.E. Human reproduction conception and contraception. Male contraception. Edited by Hafez E.S.E. Harper & Row Publishers. 2nd ed. Univ. Wayne; Detroit, Michigan. 1979: 843-853.
- 34.- Sjovall E. Manual of Family Planning and Contraception Practice. Coitus Interruptus. Ed by Baltimore, Williams and Wilkins. 2nd ed. 1970.
- 35.- Bernstein G. Clinical effectiveness of an aerosol contraceptive foam. Contraception. 1971; 3: 37-42.
- 36.- Johnson A, Maness R, Wheeler R. Calcareous deposits formed in IUDS in human exposures. Contraception. 1976; 14: 507-517.
- 37.- Timonen H. Copper release from copper T intrauterin devices. Contraception. 1976; 13: 1-12.
- 38.- Huacuja R, Delgado N, Aznar R, Rosado A. Mineral deposits formation in bioactive IUDS. Adv. Contra. Delv. Sys. 1987; III: 251-258.
- 39.- Koetsawan S. Injected long-acting medroxiprogesterone acetate effect on human lactation and concentration in milk. J. Med. Assoc. Thai. 1977; 60: 57-60.

- 40.- Qian SZ, Zhong CQ, Xu N, Xu Y. Antifertility effect of Tripterygium willfordii in men. Adv. Contracep. 1986; 2: 253-254.
- 41.- Hewitt BR. Spectrophotometric Determination Antrona of total Carbohydrates. Nature. 1950; 182: 246.
- 42.- Domínguez XA. Métodos de Investigación Fitoquímica. Saponinas y Sapogenias. Ed Limusa. 1973; 11: 149.
- 43.- Toullet P, Voisin GA. Spermatotoxic, spermagglutinating and cytotoxic activities of Guinea pig autoantibodies to sperm autoantigen T. J. Rep. Fert. 1974; 37: 299-313.