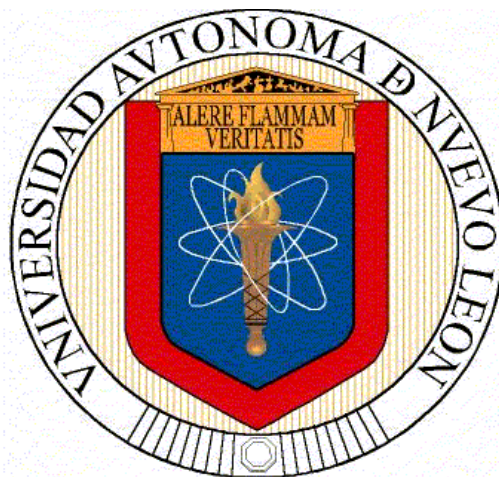


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE
CUATRO PLANTAS MEDICINALES DEL NORTE DE MÉXICO SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA EN RATAS MACHO WISTAR**

**POR:
MBC MIGUEL ANGEL TÉLLEZ LÓPEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L. MARZO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE
CUATRO PLANTAS MEDICINALES DEL NORTE DE MÉXICO SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA EN RATAS MACHO WISTAR**

POR:

MBC MIGUEL ANGEL TÉLLEZ LÓPEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES**

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L.

MARZO 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE
CUATRO PLANTAS MEDICINALES DEL NORTE DE MÉXICO SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA EN RATAS MACHO WISTAR**

Por:

MBC MIGUEL ANGEL TÉLLEZ LÓPEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS con
acentuación en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

San Nicolás de los Garza, N.L.

Marzo 2014

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE
CUATRO PLANTAS MEDICINALES DEL NORTE DE MÉXICO SOBRE LA
CALIDAD ESPERMÁTICA EN RATAS MACHO WISTAR

Comité de Tesis

Presidente: Dra. María Eufemia Morales Rubio

Vocal: Dr. Jaime Fco. Treviño Neávez

Vocal: Dra María Julia Verde Star

Vocal: Dra. Catalina Rivas Morales

Secretaria: Dra. Azucena Oranday Cárdenas

San Nicolás de los Garza, N.L.

Marzo 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE
CUATRO PLANTAS MEDICINALES DEL NORTE DE MÉXICO SOBRE
LA CALIDAD ESPERMÁTICA EN RATAS MACHO WISTAR**

Por:

MBC MIGUEL ANGEL TÉLLEZ LÓPEZ

Que presenta como requisito parcial para obtener el grado de DOCTOR EN
CIENCIAS con acentuación en QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES

Dra. María Eufemia Morales Rubio
Director Interno

Dr. Luis Benjamín Serrano Gallardo
Director Externo

Dr. Javier Moran Martínez
Asesor Externo

San Nicolás de los Garza, N.L.

Marzo 2014

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta aquí, que a pesar de las pruebas difíciles que he tenido en el camino siempre he sentido tu presencia y amor.

A Milagros Itzel Cedillo Sánchez, porque has estado a mi lado en cada momento difícil de este camino, yo sé que sin tu apoyo, amor y solidaridad esto nunca lo hubiera logrado.

A mi hijo Sebastián, ahora sé que eres muy pequeño, y aún ni a leer aprendes, pero has sido uno de los motivos más importantes para atreverme a llegar hasta aquí.

A mis padres, durante toda su vida se han preocupado por mi bienestar, infinidad de veces tuve angustia en este proceso y aunque no siempre se los dije, yo sé que Ustedes sabían cuando más los necesitaba porque nunca me dejaron solo.

A María de Jesús Cedillo Gómez, en este andar de la vida he aprendido muy pocas cosas, una de esas cosas que he aprendido es que amigos como Usted no existen muchos, Usted con su ejemplo y amistad me han enseñado que aún existen personas que puedan dar todo sin pedir nada a cambio.

A mis hermanos: Carlos, Felipe y César

AGRADECIMIENTOS:

Dra. María Eufemia, muchas gracias por su apoyo, excelente dirección y buenos consejos a lo largo de estos tres años, es un honor para mí haberla conocido y trabajar a su lado durante este tiempo ya que es una investigadora y persona con una calidez humana incomparable.

Dr. Luis Benjamín Serrano, muchas gracias por todo lo que ha hecho por mi, ha sido no solo un director de tesis excelente, también ha sido un gran amigo y ejemplo a seguir.

Dr. Javier Morán, muchas gracias por toda su ayuda, ha sido una persona que me ha demostrado que con voluntad, deseos y constancia podemos lograr lo que nos proponemos.

Dra. Julia Verde Star, muchas gracias Doctora, en verdad es una persona auténtica y que a pesar de toda su experiencia y todo lo que representa como Investigadora nos ha brindado siempre la mano para que este objetivo de vida se logre.

Dra. Catalina y Dra. Azucena, gracias por su guía y buenos consejos para la realización de este trabajo de investigación, las respeto y las admiro.

Dr. Jaime Fco.. gracias por su apoyo en lo estadístico y por sus palabras de aliento a lo largo de estos tres años.

Maestro Sergio gracias por toda su disposición para servir y por su ayuda en la realización de los ensayos.

M.C. Nadia Deniss, muchas gracias Nadia por tu amistad y apoyo incondicional, no solo en este trabajo de investigación también como amiga.

Ing. Joel, muchas gracias por tu apoyo en la realización de los ensayos, eres una persona entusiasta y comprometida mis respetos.

Joaquín Avalos, gracias compadre, no sé si ha sido casualidad o qué, pero siempre ha estado conmigo en los momentos más difíciles, yo creo que por que Usted siempre me mete en apuros.

Oscar Landeros, gracias por tu amistad.

MBC Carmen Vega, gracias por su amistad y compañía en los viajes a Monterrey.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León

- Departamento de Química Analítica

Al CONACYT por la beca otorgada 372504

A la Universidad Juárez del Estado de Durango por su apoyo y facilidades para estudiar este Doctorado.

A las Instituciones y Departamentos que me recibieron para la realización y apoyaron en la parte experimental del proyecto de tesis:

Facultad de Ciencias Químicas Universidad Juárez del Estado de Durango

- Departamento de Investigación

Centro de Investigación Biomédica de la Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Coahuila.

- Departamento de Biología Celular y Ultra-estructura
- Departamento de Bioquímica y Farmacología, laboratorio de Etnofarmacología.
- Bioterio

ÍNDICE

DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS:	VI
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	VIII
ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVOS	7
4. ANTECEDENTES	8
4.1 Plantas medicinales	8
4.2.1 Metabolitos secundarios de las plantas medicinales	9
4.2.2 Plantas medicinales que modifican la fertilidad	10
4.3 Hormonas dependientes del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas	12
4.4 Daño al ADN en Células Espermáticas por Ensayo Cometa	13
4.5 Prueba de ELISA para la determinación de los niveles séricos de hormonas	14
4.6 Bioensayos de Toxicidad	14
4.7 Características de las especies estudiadas	15
4.7.1 <i>Tagetes lucida</i> Cap	15
4.7.2 <i>Lippia graveolens</i> HBK	17
4.7.3 <i>Opuntia ficus-indica</i> L. Miller	19
4.7.4 <i>Cynodon dactylon</i> L. Pers	21
5.- MATERIALES Y MÉTODOS	25

5.1 Lugar, área de trabajo y periodo de estudio	25
5.2 Material biológico	25
5.2.1 Vegetal	25
5.2.2 Huevecillos de <i>Artemia salina</i>	25
5.2.3 Animales de experimentación	25
5.3 Metodología	27
5.3.1 Colecta de las plantas en estudio	27
5.3.2 Obtención de los extractos metanólicos de las plantas	27
5.3.3 Análisis fitoquímico preliminar para identificación parcial de los componentes de los extractos	28
5.3.4 Toxicidad de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre <i>Artemia salina</i>	31
5.3.5 Diseño experimental	32
5.3.6 Evaluación de los niveles séricos de Testosterona en ratas macho <i>Wistar</i>	33
5.3.7 Evaluación de los parámetros de Calidad espermática en ratas macho <i>Wistar</i>	34
5.3.8 Electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa)	35
5.3.9 Evaluación histológica de testículo de rata macho <i>Wistar</i>	37
5.3.10 Particiones del extracto crudo de <i>Opuntia ficus-indica</i> con solventes de distintas polaridades	38
5.3.11 Identificación de compuestos presentes en las fracciones activas, por cromatografía de gases acoplado a masas.	39
6.- RESULTADOS	40
6.1 Análisis fitoquímico preliminar para identificación parcial de los componentes de los extractos de las plantas en estudio	40
6.1.1 Identificación por medio de reacciones químicas	40
6.2 Toxicidad de los extractos metanólico de las plantas en estudio sobre <i>Artemia salina</i>	42
6.3 Tratamiento por vía oral a ratas macho <i>Wistar</i> de los extractos metanólicos de las plantas en estudio	42
6.3.1 Evaluación de los niveles séricos de Testosterona en ratas macho <i>Wistar</i>	43
6.3.2 Evaluación de los parámetros de Calidad espermática en ratas macho <i>Wistar</i>	44
6.3.3 Peso y longitud de testículos y epidídimos de controles y tratamiento	45

6.3.4 Electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa)	46
6.3.5 Evaluación histológica de testículo de rata macho <i>Wistar</i>	47
6.4 Evaluación de bioactividad sobre la reproducción de las particiones del extracto de <i>Opuntia ficus-indica</i> en ratas macho <i>Wistar</i>	48
6.4.1 Particiones del extracto crudo de <i>Opuntia ficus-indica</i> con solventes de distintas polaridades	51
6.5 Identificación de compuestos presentes en las fracciones activas, por cromatografía de gases acoplado a masas.	51
7.- DISCUSIÓN	55
8.- CONCLUSIONES	64
9.- REFERENCIAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No	Contenido	Página No
1	<i>Tagetes lucida</i> Cap	15
2	<i>Lippia graveolens</i>	17
3	<i>Opuntia ficus-indica</i>	20
4	<i>Cynodon dactylon</i>	23
5	Diagrama de la obtención de los extractos metanólicos	28
6	Diagrama del ensayo de letalidad de los extractos sobre <i>Artemia salina</i> en microplaca	32
7	Diagrama de la evaluación de los niveles séricos de Testosterona con Kits comerciales de ELISA	34
8	Diagrama de la electroforesis en gel de células individuales (ensayo cometa)	37
9	Micrografía de los cortes histológicos de testículos de ratas tratadas y controles	48
10	Micrografía de los niveles de daño en células espermáticas de ratas tratadas con las particiones de <i>Opuntia ficus-indica</i>	49
11	Micrografía de los cortes histológicos de testículos de ratas tratadas con las particiones del extracto metanólico de <i>Opuntia ficus-indica</i>	50
12	Cromatograma de la partición soluble en cloroformo del extracto metanólico de <i>Opuntia ficus-indica</i>	53
13	Cromatograma de la partición soluble en hexano del extracto metanólico de <i>Opuntia ficus-indica</i>	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No	Contenido	Página No
1	Ubicación geográfica de las especies recolectadas	26
2	Rendimiento de las plantas secas en estudio procesadas por maceración en metanol	40
3	Análisis fitoquímico para la identificación de los grupos funcionales presentes en los extractos metanólicos de la plantas en estudio	41
4	Actividad tóxica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre <i>Artemia salina</i>	42
5	Peso corporal promedio de los animales en estudio en diversos intervalos de tiempo	43
6	Niveles séricos de Testosterona en ratas macho Wistar	44
7	Evaluación de la densidad, motilidad, viabilidad de células espermáticas de ratas macho Wistar	45
8	Medición del peso y longitud de testículos y epidídimos de ratas tratadas y controles.	46
9	Evaluación de los niveles de daño en células espermáticas de ratas macho Wistar por medio del ensayo cometa	47
10	Evaluación de los niveles séricos de testosterona y calidad espermática en ratas tratadas con las particiones del extracto de <i>Opuntia ficus-indica</i>	49
11	Rendimiento de las particiones del extracto metanólico de <i>Opuntia ficus-indica</i>	51

ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
Cel	Células
DL₅₀	Dosis Letal Media
Cm	Centímetros
D	Días
G	Gramos
H	Horas
M	Metros
Mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
DMSO	Dimetil Sulfóxido
Nm	Nanómetros
UA	Unidades Arbitrarias
OMS	Organización Mundial de la Salud
RF	Ratio of Front
WHO	World Health Organization
µg	Microgramos
µL	Microlitros
Kg	Kilogramo
CG-MS	Cromatografía por gases masas

RESUMEN

Con el interés de profundizar en el conocimiento de los productos naturales que pudiesen intervenir en la espermatogénesis afectando parámetros de calidad espermática, en este trabajo se evaluó la calidad de la función reproductiva a ratas macho *Wistar*, las cuales se dividieron en grupos a los que se les administro extractos metanólicos de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens* H.B.K., *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica*, a una concentración de 50 mg/kg, seleccionando estas especies vegetales por sus antecedentes de actividad contra la reproducción a nivel empírico y científico, así mismo se manejaron controles positivos (ratas expuestas con Undecanoato de Testosterona) y negativos (Agua destilada). El extracto que presento mayor bioactividad a nivel reproductivo fue el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*, afectando los niveles séricos de testosterona por encima de los demás grupos, la concentración, movilidad y viabilidad espermática, en este grupo comparado con los demás grupos tratamiento, presento una disminución marcada en dichos parámetros, siendo la concentración espermática de 10.80×10^6 Cel/mL, motilidad de 28.6 % y una viabilidad de 31.8 %, así mismo este grupo presento mayor efecto genotóxico en los espermatozoides por medio del ensayo cometa con 349.20 Unidades arbitrarias (UA). Los testículos de las ratas evaluados por medio de métodos histológicos en el grupo de *Lippia graveolens* y *Opuntia ficus-indica* mostraron espacios denominados cisternas, los cuales ocasionan un arresto en la producción de espermatozoides en el haz de luz de los túbulos seminíferos produciendo efectos en la calidad espermática y estructura testicular. En base a los resultados obtenidos con este extracto se realizaron particiones con solventes de distinta polaridad como cloroformo y hexano y se evaluaron nuevamente los parámetros ya mencionados resultando la partición soluble en cloroformo la más bioactiva.

Estudios complementarios deben de ser propuestos para la evaluación de la fertilidad completa y reversible con estos extractos y otras fracciones de estas plantas.

ABSTRACT

In the interest of deepening the knowledge of natural products which may be involved in spermatogenesis affecting sperm quality parameters in this work was evaluated the quality of reproductive function in Wistar male rats , which were divided into groups that were administered methanol extracts of *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens* HBK, *Tagetes lucida* and *Opuntia ficus -indica*, at a concentration of 50 mg / kg, plants were selected according for their empirical and scientific history against reproductive activity, so it is managed positive controls (rats exposed to testosterone undecanoate) and negative control (distilled water) .

The higher reproductive bioactivity level was the in the methanolic extract of *Opuntia ficus -indica*, affecting serum testosterone levels above other groups, sperm concentration, sperm motility and viability, in this group compared with the other treatment groups, presented a marked decrease in these parameters, being the concentration of 10.80×10^6 Cel sperm / mL , motility of 28.6 % and a viability of 31.8 % , also this group had higher genotoxic effect on sperm through comet assay with 349.20 arbitrary units (AU). The testes of rats assessed by histological methods in the group of *Lippia graveolens* and *Opuntia ficus-indica* showed spaces called cisterns, which cause an arrest in the production of sperm in the light beam of the seminiferous tubules, producing adverse effects on sperm quality and testicular structure. Based on the results obtained with *Opuntia ficus-indica* extract, were performed partitions with different polarity solvents as chloroform and hexane and reassessed parameters resulting chloroform the more bioactive.

Further studies should be proposed for full fertility evaluation and reversible with these extracts and other fractions of these plants.

1. INTRODUCCIÓN

El semen normal es una mezcla de espermatozoides suspendidos en las secreciones testiculares y epididimarias, que luego se combinan con las secreciones prostáticas, de las vesículas seminales y de las glándulas bulbouretrales. El análisis seminal por tanto permite dar información sobre la espermatogénesis y la condición fisiológica de los tejidos comprometidos (Aitken, 2010). En la década de los 50, MacLeod & Gold (1953) comenzaron a comparar los seminogramas de personas fértiles con pacientes con problemas para concebir un hijo, encontrando una estrecha relación entre la concentración espermática, la motilidad de ellos y su influencia en la capacidad fecundante de los varones en estudio. En los últimos años el análisis seminal continúa siendo una de las mejores herramientas en la investigación de la fertilidad masculina y la que brinda la mejor información previa para evaluar la calidad reproductiva de los varones (Espinoza-Navarro y Sarabia, 2011), dentro del campo de la salud reproductiva, la infertilidad implica una deficiencia que no compromete la integridad física del individuo ni amenaza su vida (Brugo-Olmedo y col, 2003).

Se han investigado varios enfoques posibles para la inducción de la infertilidad durante un largo período, incluidos los métodos químicos, inmunológicos y hormonales. Sin embargo, ningún método es eficaz y libre de efectos secundarios. Investigaciones sobre el desarrollo de un anticonceptivo hormonal para los hombres, análogos a los estrógenos y las píldoras de progesterona utilizadas con tanto éxito por las mujeres se han llevado a cabo debido a que los preservativos y la vasectomía tienen cada uno deficiencias (Amory y col, 2006).

Para los países desarrollados y subdesarrollados el crecimiento de la población está afectando no solamente la economía sino también los aspectos sociales (Gopalkrishnan y Shimpi, 2011; Amory, 2008). Actualmente muchos gobiernos y dependencias no gubernamentales se encuentran trabajando para controlar el crecimiento desmedido de la población. A pesar de esto, en los últimos años, la población está aumentando a un ritmo alarmante (Amory, 2008). La población

mundial supera los 7 mil millones de habitantes y está aumentando en 80 millones al año. En muchas partes del mundo, la superpoblación es la causa principal del sufrimiento humano y la degradación del medio ambiente. Gran parte de este crecimiento de la población es poco deseado. Organizaciones de Planificación familiar estiman que la mitad de todos los embarazos no son planeados y la mitad de los embarazos resultantes son no deseados (Amory y col, 2006). Esto último ocasiona aumento de las tasas de aborto, niños no deseados, incremento de la pobreza y abandono. Por consiguiente existe la necesidad de un mejor acceso a los anticonceptivos existentes, una mejor educación sexual y una mayor opción en la selección de anticonceptivos (Amory y col 2006; Álvarez-Gómez, 2007).

Una de las causas en el aumento de la población se debe a que la mayoría de los anticonceptivos están disponibles sólo para las mujeres y las opciones para controlar la concepción en los hombres son limitadas, principalmente el uso del condón y la vasectomía (Amory y col 2006; Amory, 2008; Bajaj y Gupta, 2011).

A pesar de esto, los hombres representan actualmente un tercio del uso de anticonceptivos (Amory y col 2006). En un estudio que realizó la Organización Mundial de la Salud (OMS) encontró que entre el 45 y el 71 por ciento de los hombres daría la bienvenida a un anticonceptivo seguro, reversible, conveniente y sin cirugía, que se podría utilizar por separado de las relaciones sexuales (Bhatt y col, 2007).

Los productos de plantas medicinales tienen una larga historia de uso en la India, China y otras regiones del mundo aunque no en todos los casos se han realizado investigaciones científicas que validen su uso (Khillare y Shrivastav, 2003).

Históricamente desde el siglo XIX las plantas han contribuido en el desarrollo de los anticonceptivos orales femeninos, pero la búsqueda de nuevos anticonceptivos masculinos se encuentra en una etapa incipiente (Gopalkrishnan y Shimpi, 2011).

La regulación de la fecundidad con plantas o preparados de plantas han sido reportadas en la literatura médica antigua de los pueblos indígenas. Un gran

número de especies de plantas con efectos anticonceptivos han sido analizados en China y la India hace unos 50 años y se reforzaron posteriormente por los organismos nacionales e internacionales (Mali y col, 2002).

En México son pocas las fuentes que reportan métodos anticonceptivos tradicionales, en razón de que existen grandes prejuicios, tanto religiosos como morales, así como temor a enfermedades de transmisión sexual y trastornos que pudieran sobrevenir por su uso. Sin embargo, determinantes de tipo económico son generalmente los que propician la necesidad de prevenir un nuevo embarazo (UNAM, 2009).

La flora del semidesierto chihuahense ha sido poco estudiada y la literatura científica aporta pocas referencias sobre su actividad farmacológica. Por el interés de profundizar en el conocimiento de la flora mexicana y su posible contribución a la etnofarmacología, se diseñó este trabajo con el objetivo de evaluar la actividad biológica sobre la fertilidad de la rata macho con la administración oral de los extractos de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens*, *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica* que crecen en el Norte de México. Estas especies vegetales pueden contener metabolitos secundarios con potencialidad para desarrollar nuevas fármacos antifertilidad.

2. HIPÓTESIS

La administración oral de los extractos metanólicos de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens*, *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica* influye sobre la liberación de testosterona afectando la calidad espermática y la estructura testicular de ratas macho *Wistar*.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los extractos metanólico de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens*, *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho *Wistar*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Colectar el material vegetativo.
2. Obtener los extractos metanólicos por maceración de hojas secas de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens* H.B.K., *Ceterach officinalis*, *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica*.
3. Determinar en forma parcial, mediante pruebas coloridas los grupos funcionales presentes en los extractos.
4. Determinar la actividad tóxica *in vitro* de los extractos crudos por medio del ensayo con nauplios de *Artemia salina* en microplaca.
5. Evaluar la actividad de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre los niveles séricos de las hormonas reproductivas de las ratas.
6. Valorar la calidad espermática de las ratas expuestas y los controles
7. Valorar la integridad del material genético del espermatozoide de las ratas expuestas y controles por medio del ensayo cometa.
8. Evaluar histológicamente los testículos de las ratas expuestas
9. Fraccionar los extractos metanólicos que presentan actividad biológica sobre la reproducción con solventes de distinta polaridad.
10. Identificar los grupos funcionales de las fracciones de los extractos por cromatografía de gases acoplado a masas.

4. ANTECEDENTES

4.1 Plantas medicinales

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud una planta medicinal se define como cualquier especie vegetal silvestre o cultivada que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos curativos y cuyos principios activos pueden servir como precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Desde tiempos remotos, los pueblos primitivos atribuían los efectos curativos de las plantas a la intervención de alguno de sus Dioses. Se calcula que aproximadamente el 80 % de la población mundial al menos en alguna ocasión ha utilizado las plantas medicinales como recurso terapéutico primario para el cuidado de la salud (Farnsworth, 1997). Algunos autores sostienen que el uso de las plantas medicinales está sustentado en la acumulación y transmisión de experiencias de generación a generación durante cientos de años (Kamboj, 2000), y en muchos casos es el más importante recurso de la atención primaria de la salud sobre todo de las comunidades indígenas y rurales (Sukh, 1999). Un claro ejemplo se presenta en China, en donde la atención primaria de la salud se sustenta en el uso del conocimiento milenario de las plantas medicinales (Zanoli *et al.*, 2009). Los científicos han descubierto y desarrollado drogas efectivas para el tratamiento de diversas afecciones a partir de compuestos aislados de diferentes plantas (Barquero, 2007).

La investigación científica de las plantas utilizadas en medicina tradicional con un enfoque multidisciplinario se ha incrementado en todo el mundo, una gran variedad de especies se han estudiado y se ha acumulado suficiente evidencia científica sobre sus propiedades farmacológicas (Dahanukar y Kulkarni, 2000). Con este conocimiento, la industria farmacéutica a partir de los ingredientes activos aislados de las plantas ha logrado sintetizar aproximadamente el 25 % de los medicamentos más exitosos del mercado, por ejemplo la aspirina y el tamoxifén (Tripathi 2003).

La Etnobotánica reúne información dentro de una estructura científico tecnológico de los recursos naturales a través de los cuales pueda contribuir a la ejecución de diversos planes de desarrollo en cualesquier nación, siendo especialmente útil en la planificación del desarrollo de aquellas regiones donde se obtuvieron los datos. La etnobotánica se ha definido como el estudio de las interrelaciones entre el hombre primitivo y las plantas o "la totalidad de la gente con las plantas en una cultura y la interacción directa de la gente con esas plantas" (González-Chávez, 2008).

4.2.1 Metabolitos secundarios de las plantas medicinales

Los compuestos químicos de las plantas son de estructura diversa y según su naturaleza química se clasifican en compuestos procedentes del metabolismo primario y del metabolismo secundario. Los principios biológicamente activos derivados del metabolismo secundario han jugado un rol muy importante en la aportación de precursores de medicamentos para tratar diversas enfermedades (Sukh Dev. 1999). Los constituyentes químicos presentes en las plantas son parte importante de su fisiología y se ha comprobado que desde el punto de vista bioquímico, muestran cierta compatibilidad a nivel molecular con el cuerpo humano, modificando alguna o varias funciones. Los compuestos del metabolismo secundario son de interés por su actividad biológica conforman los siguientes grupos; fenoles simples y ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, taninos, terpenos, alcaloides, aceites esenciales, polipéptidos y otros grupos aún sin clasificar (Kuklinsky, 2000).

A pesar del gran avance en la fitoquímica, todavía hay un vacío en el conocimiento completo de la composición química de las plantas, lo que es motivo para la búsqueda de nuevos compuestos químicos y su relación con la actividad biológica, para ello el aislamiento e identificación de los constituyentes vegetales en la actualidad se realiza con mayor exactitud y rapidez con el desarrollo de mejores y nuevas herramientas en química analítica. Algunas de las técnicas analíticas útiles son la cromatografía en sus diferentes variedades,

los análisis espectrales de resonancia magnética nuclear, el análisis infrarrojo y la espectrometría de masas (Harvey A, 1999; Hostettmann *et al.*, 1997). La cromatografía de gases-masas es una técnica de alta especificidad que se aplica a sustancias volátiles o que pueden dar derivados volátiles, trabaja con altas temperaturas en un horno a diferentes gradientes de temperatura, es una técnica cuya plataforma es de utilidad para establecer el perfil fitoquímico de las especies vegetales (Lytovchneko *et al.*, 2009).

4.2.2 Plantas medicinales que modifican la fertilidad

A pesar del avance de la medicina occidental, todavía no se han desarrollado medicamentos seguros y eficaces para tratar algunas enfermedades como la diabetes, diversos tipos de cáncer, la enfermedad de Alzheimer, HIV-SIDA entre otras, quizá algunas plantas aún no estudiadas científicamente, pueden contener sustancias activas para dichas enfermedades (Kamboj, 2000).

En reproducción humana, se presenta la oportunidad de buscar en la medicina tradicional y especialmente en plantas medicinales, nuevas alternativas de regulación de la fertilidad (Talwar *et al.*, 1997). La importancia de los agentes espermicidas como método regulador de la fertilidad, unido a la existencia en la literatura científica y en el conocimiento popular de la diversidad vegetal que tienen efectos espermicidas, permite pensar en una propuesta interesante para un método regulador de la fertilidad de origen vegetal, que conserve las conocidas ventajas espermicidas sin el problema de la citotoxicidad contra el epitelio (Shakti *et al.*, 1993). Algunas de las plantas con actividad en la fertilidad según Álvarez-Gómez *et al.*, (2007) son las siguientes: *Abrus precatorius* (chocho de pinta negra), *Albizia lebbbeck* (carbonero de sombrío o dormilón), *Aloe vera* (penca sábila), *Ananas comosus* (piña), *Anethum graveolens* (eneldo), *Apium graveolens* (apio), *Azardactha indica* (árbol del neem) (Shakti *et al.*, 1993), *Bursera fagaroides* (cuijote), *Calendula officinalis* (El botón de oro, corona de rey, caléndula, caldo, flamenquilla, flor de difunto, maravilla, rosa de

mueritos o cempasúchitl), *Carica papaya* (papaya), *Citrus limón* (limón), *Cúrcuma longa* (azafrán de la India), *Cyclamen persicum* y *primula vulgaris* (violetas de los andes y primaveras), *Eupatorium brevipes*, *Gypsophila paniculata* (paniculata, velo de novia o gisófila), *Momordica charantia* (balsamina o sibicogén), *Passiflora edulis* (maracuyá o fruta de la pasión), *Pithecellobium saman* (samán o árbol de lluvia).

En las pasadas décadas, se ha enfocado en la investigación y desarrollo de un inhibidor de la fertilidad masculina, que sea efectivo y seguro, que produzca azoospermia reversible, incluida la inducción de la infertilidad por supresión de la producción espermática por métodos hormonales y no hormonales (López *et al.*, 2005). Recientemente, en la regulación de la fertilidad se han utilizado productos derivados de plantas con baja toxicidad (Singh A y Singh SK, 2008). En estudios realizados en la semilla de soya, asociaron los compuestos Cenisteina, Dadzeina, 17 β -Estradiol y Diethylstilbestrol con la modificación de los mecanismos de la biosíntesis y liberación de la hormona liberadora de la gonadotropina hipotalámica (GnRH) y sobre las gonadotropinas pituitarias LH y FSH que están asociadas con la fertilidad (Huang, 1999).

Estudios realizados en ganado vacuno, han demostrado que la incorporación de *Cynodon dactylon* (Pasto Bermuda) en la dieta, lleva a una disminución de la tasa de reproducción (Banta *et al.*, 2008). Por otro lado, estudios etnobotánicos realizados en México y en la zona mediterránea de Europa, reportan el uso tradicional de *Ceterach officinarum* (Doradilla), como método de anticoncepción, sin que este haya sido probado completamente (Guarrera, 2008; Marquez *et al.*, 1999). Lo mismo se puede decir de los estudios con extracto de *Lippia graveolens* (orégano), el cual se conoce que puede llegar a ser tóxico en altas dosis y la creencia tradicional de que ingerido en tè tiene efectos sobre la reproducción (Longe, 2005). Existe evidencia empírica de que comunidades en el Estado de Durango utilizan *Tagetes lucida* (yerbanís) y *Opuntia ficus-indica* (nopál), como métodos de control reproductivo. De acuerdo a lo anterior, existe evidencia de las propiedades anticonceptivas de estas plantas, aunque ninguna ha sido comprobada científicamente (González *et al.*, 2004).

4.3 Hormonas dependientes del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas

La mayoría de las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas están implicadas en el desarrollo de las características sexuales primarias y secundarias y del control de la gametogénesis y de la reproducción, las funciones de los testículos y los ovarios se regulan por hormonas gonadotrópicas segregadas por la adenohipófisis (Voet *et al.*, 2006). Las gonadotropinas estimulan en las gónadas la secreción de sus hormonas esteroideas sexuales, y estas hormonas esteroideas, a su vez, ejercen un efecto inhibitorio sobre la secreción de las gonadotropinas (Murray, *et al.*, 2010). La adenohipófisis produce y segrega dos gonadotropinas; FSH (hormona estimulante del folículo) y LH (hormona luteinizante). Aunque estas dos hormonas reciben el nombre de acuerdo con sus acciones en la mujer, las mismas hormonas son segregadas por la hipófisis del varón. Las gonadotropinas ejercen tres efectos fundamentales sobre las gónadas: 1) estimulación de la espermatogénesis u ovogénesis, 2) estimulación de la secreción hormonal gonadal y 3) mantenimiento de la estructura de las gónadas (Lehninger, *et al.*, 1993). La secreción de LH y de FSH por la adenohipófisis se estimula por una hormona producida por el hipotálamo y segregado a los vasos porta hipotálamo hipofisarios. Además de las hormonas esteroideas, los testículos y los ovarios segregan una hormona polipeptídica denominada inhibina. La inhibina se segrega por las células de Sertoli de los túbulos seminíferos en los varones y por las células de la granulosa de los folículos ováricos en las hembras. Esta hormona inhibe de forma específica la secreción adenohipofisaria de FSH sin afectar la secreción de LH. Aunque las interacciones de hipotálamo-hipófisis-gónada son similares en ambos sexos, existen importantes diferencias. La secreción de las gonadotropinas y de los esteroides sexuales es más o menos constante en los varones adultos (Stuart, 2003).

4.4 Daño al ADN en Células Espermáticas por Ensayo Cometa

La genotoxicidad es el resultado nocivo de la interacción de agentes químicos o físicos con el aparato hereditario de la célula, y se manifiesta como alteraciones genéticas y/o cambios en el número o estructura de los cromosomas, que pueden incorporarse en generaciones celulares subsecuentes llamadas mutaciones (Clayson y Grant, 1992). La determinación genotóxica ya sea en compuestos naturales con fines terapéuticos, resultan una herramienta útil para la identificación de riesgos a la salud humana y poder desarrollar medidas de prevención y control ya que las mutaciones que alteran la expresión génica se consideran como un rasgo común de todos los cánceres, aunque muchas de ellas pueden ser ventajosas o neutras y no ocasionar manifestaciones patológicas (Cortinas y Aguirre, 1990). La técnica del ensayo cometa se trata de una aplicación particular de la técnica de electroforesis de ADN que se utiliza de forma rutinaria en biología molecular pero trasladada al campo de la biología celular. En este caso, el ADN de un núcleo es provisto de proteínas y que contenga roturas en su ADN, será movilizado con mayor eficacia hacia el polo positivo del campo eléctrico y esta movilización se relacionará con el tamaño de los fragmentos que contenga el núcleo (Singh, *et al.*, 1988). La metodología requiere la inclusión de una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos, para someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfihidrido que se encuentran en las protaminas del espermatozoide. Estos núcleos desproteinizados se someten a electroforesis para luego ser teñidos con sustancias fluorescentes específicas para el ADN, tales como el DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole), IP (Ioduro de Propidio) o SYBR-GREEN (Synergy Brand). El ADN fragmentado se desplazará por la acción del campo eléctrico y generará una imagen similar a la cola de un cometa. Aquellos espermatozoides con su ADN íntegro no producen fragmentos de ADN y sólo generan imágenes de colas discretas. Aquellos núcleos que tienen su ADN dañado muestran un claro desplazamiento de los múltiples fragmentos de ADN. Esta técnica puede ser conjugada con

hibridación in situ y de esta forma se puede estudiar el daño diferencial en secuencias de ADN de forma específica. Combinado con electroforesis bidimensional y utilizando distintas condiciones desnaturalizantes, se podría evaluar el daño producido en ADN de cadena doble o sencilla, para una correcta interpretación de los resultados, se realiza un análisis de imagen con un software específico para que la prueba pueda tener cierto nivel de objetividad (Singh *et al.*, 1988).

4.5 Prueba de ELISA para la determinación de los niveles séricos de hormonas

El procedimiento sigue el principio básico del inmunoensayo, que consiste en la competición entre un antígeno sin marcar y otro marcado con enzimas unidos a los lugares de unión de los anticuerpos. La cantidad de antígeno marcado con enzima que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del analito no marcado presente (González *et al.*, 1999).

4.6 Bioensayos de Toxicidad

Un bioensayo puede ser definido como cualquier prueba que involucra organismos vivos, permite realizar mediciones experimentales del efecto de agentes químicos en sistemas biológicos, estableciendo relaciones de concentración-respuesta bajo condiciones controladas, al llevar a cabo bioensayos es necesario llevar a cabo estandarizaciones de referencia (EPA, 2002). El principal objetivo de este tipo de estudio es evaluar el nivel de estímulo necesario para obtener una respuesta en un grupo de individuos de la población. Existen métodos alternativos como el bioensayo *in vitro* para determinar la toxicidad en larvas de *Artemia salina* (Lagarto *et al.*, 2001). El ensayo permite la evaluación rápida y conveniente de extractos crudos, fracciones y compuestos puros; y además comparar varias partes de la planta y establecer variaciones estacionales en plantas individuales. También puede ser

utilizado para establecer la actividad biológica de compuestos sintéticos (McLaughlin *et al.*, 1998).

4.7 Características de las especies estudiadas

4.7.1 *Tagetes lucida* Cap

Pertenece a la familia Asteraceae, se le conoce con el nombre común de yerbaniz. Es una yerba perenne erecta, de hasta 80 cm de alto, con fuerte olor a anís al estrujarse. Presenta hojas opuestas sésiles lineares a oblongas, de margen aserrado. Capítulos florales con la base alargada, tres o cuatro florecillas ligadas de color amarillo, florecillas del disco también amarillas. Posee aquenios de forma lineal claviforme. Se le localiza en la sierra, pastizales y bosques. (González *et al.*, 2004)



Figura 1. *Tagetes lucida* Cap

(Fotografía de Pedro Tenorio Lezama)

Clasificación taxonómica (Martínez, 1979)

Plantae

Magnoliophyta

Magnoliopsida

Asterales

Asteraceae

Tageteae

Tagetes L.

T. lucida

Fitoquímica

De las flores se han aislado terpenos, fenilpropanoides y varias cumarinas de la planta completa (Márquez *et al.*, 1999). También se reporta un aceite esencial con estragol, varios flavonoides, taninos, pectina y gomas (González *et al.*, 2004).

Usos en medicina tradicional

Se elabora un té, el cual sirve para aliviar cólicos, dolor de estómago, empacho, vómito, diarrea y disentería, como estimulante, para que el cuerpo entre en calor después del parto, para evitar el insomnio, aliviar los dolores de “aire”, tos, asma, resfriados y tifoidea.

Se registra como antihelmíntico, abortivo, emenagogo y carminativo.

Otro uso común en el país son los emplastos de hojas y tallos para tratar los granos y espinillas (González *et al.*, 2004).

4.7.2 *Lippia graveolens* HBK

Es una herbácea perenne aromática de la familia de las Verbenáceas. Se le conoce con el nombre común de orégano del cerro. La planta forma un pequeño arbusto achaparrado de unos 45 cm de alto, los tallos, que a menudo adquieren una tonalidad rojiza, se ramifican en la parte superior y tienden a deshojarse en las partes más inferiores. Las hojas surgen opuestas, ovales y anchas de entre 2-5 cm, con bordes enteros o ligeramente dentados y con vellosoidad en el envés.

Las diminutas flores, de color blanco o rosa, que nacen en apretadas inflorescencias terminales muy ramificadas están protegidas por diminutas hojillas de color rojizo. (Márquez *et al.*, 1999)



Figura 2. *Lippia graveolens*

Clasificación Taxonómica (Arcila-Lozano *et al.*, 2004)

Plantae

Angiospermae

Dicotyledoneae

Sympetetalae

Tubiflorae

Verbenacea

Lippia

L. graveolens

Fitoquímica

Las hojas de la planta poseen unas pequeñas glándulas que produce la esencia aromática, que es de color amarillo limón y está constituida por un estearopteno y dos tipos de fenoles, en mayor contenido el carvacrol y en menor proporción el timol. Las raíces contienen estaquiosa y los tallos sustancias tánicas. Existen varios quimiotipos (grupo de individuos de una especie que se distingue de forma significativa del resto por su composición química) que difieren en la composición, conteniendo también sustancias como linalool, caryophyleno y D-germacren. Sin embargo estas sustancias son tóxicas para el hígado y riñones en pequeñas cantidades (Verma *et al.*, 2010). En el aceite esencial se encuentran los siguientes componentes: carvacrol (40–70%), gamma-terpineno (8–10%), p-cimeno (5–10%), alpha-pineno, myrceno, thymol, flavonoides y derivados del ácido cafeínico (Longe, 2005).

Usos en medicina tradicional

Toda la planta es rica en un aceite esencial que contiene timol y carvacrol, de acción sedante, antiespasmódica y carminativa. Contiene asimismo flavonoides y ácido ursólico, a los que se atribuyen sus propiedades antirreumáticas. Su uso está indicado en los siguientes casos: Trastornos digestivos: dispepsia (mala digestión) de origen nervioso, flatulencia, espasmos o cólicos de los órganos digestivos. Por su acción carminativa (combate los gases intestinales) (Force *et al.*, 2000). Afecciones respiratorias que cursan con tos seca o irritativa, como la laringitis (irritación de garganta) o la tos ferina. El orégano tiene también acción expectorante, béquica y antitusígena, tanto en uso interno como externo. Dolores musculares, tortícolis y lumbago, aplicado externamente tanto en cataplasmas como en fricciones sobre la piel.

Efectos farmacológicos

Podríamos destacar las siguientes acciones farmacológicas del orégano: Antimicrobiano, en el aceite de orégano encontramos timol y carvacrol cuyos principios activos poseen capacidad bactericida y fungicida. Anticatarral el orégano ayuda a eliminar mucosidades de las vías respiratorias gracias a su capacidad expectorante.

Digestivo, estimula las secreciones digestivas y es ingrediente común en la cocina mediterránea. Antiespasmódico, estimula el flujo de la bilis, evita flatulencias y ayuda a calmar los músculos digestivos. Antioxidante, uno de sus componentes, el timol, es un potente antioxidante (Faleiro, 2005).

4.7.3 *Opuntia ficus-indica* L. Miller

Aspectos Botánicos

Es una de las muchas especies conocidas como nopal. Es una planta arbustiva de la familia de las cactáceas, como la mayoría de los miembros de este género carece de hojas, los segmentos o cladodios en que se divide, son tallos capaces de ramificarse, emitiendo flores y frutos. Estos tallos son planos, ovales y de color verde medio. Poseen dos clases de espinas, reunidas en los gloquidios (especie de cojincillos) de las areolas, unas largas y duras, y otras cortas y finas con aspecto veloso. Las flores, en forma de corona, nacen de las areolas en los bordes de los segmentos. Florece una vez al año y tanto el fruto como la flor pueden ser de diversos colores, desde el amarillo al rojo. El fruto tiene una cascara gruesa, espinosa, y con una pulpa abundante en pepas o semillas. El fruto maduro es una baya de forma ovalada con diámetros de entre 5,5 y 7 cm, una longitud de 5 cm a 11 cm y un peso variable entre 43 y 220 g (Márquez *et al.*, 1999).



Figura 3. *Opuntia ficus-indica*

Clasificación Taxonómica (Martínez, 1979)

Plantae

Magnoliophyta

Magnoliopsida

Caryophyllales

Cactaceae

Opuntioideae

Opuntieae

Opuntia

Opuntia

O. ficus-indica

Fitoquímica

Se han identificado algunos componentes en el nopal, entre los que destacan: kaempferol, quercetin, narcissin, aromadendrin, taxifolin, eriodictyol, (6S,9S)-3-Oxo--ionol-D-glucopiranosido y corchoionosido (Eun Ha Lee *et al.*, 2003).

Usos medicinales

Se ha utilizado para el tratamiento de la obesidad, ya que las fibras insolubles que contiene, crean una sensación de saciedad, haciendo que disminuya el hambre de las personas y ayudan a una buena digestión, así mismo, las proteínas vegetales promueven la movilización de líquidos en el torrente sanguíneo disminuyéndose la celulitis y la retención de líquidos (Fernández-López *et al.*, 2010). Otra aplicación que tiene es contra la diabetes e hiperglucemia incrementando los niveles y la sensibilidad a la insulina logrando con esto estabilizar y regular el nivel de azúcar en la sangre (Butterweck, *et al.*, 2010). En personas con colesterol elevado se ha demostrado que el consumo de nopal, ayuda a eliminarlo evitando que se absorba gran parte de éste y así no se acumula en venas y arterias. Contiene antibióticos naturales, esta propiedad está relacionada con el metabolismo del ácido crasuláceo (CAM) de las plantas, el cual, en las cactáceas inhibe o suspende el crecimiento de varias especies bacterianas. De ahí que tanto el consumo del nopal como la aplicación de cataplasmas de pencas de nopal tengan efectos benéficos en heridas e infecciones de la piel. También se le ha dado el uso de esta planta contra el cáncer (Fernández-López *et al.*, 2010), desórdenes gastrointestinales y digestión y como abortivo (Márquez *et al.*, 1999).

4.7.4 *Cynodon dactylon* L. Pers

Aspectos botánicos

Se le conoce con el nombre común de pasto bermuda, pertenece a la familia Gramineae. Es una hierba perenne con un tamaño 10 a 30 cm de alto, pero puede tener más de largo, ya que crece con estolones. Sus tallos son delgados, glabros, erectos o decumbentes. Posee hojas en forma de vainas de 1.5 a 7 cm de largo, generalmente más cortas que los entrenudos, vilosas en el ápice, las

inferiores usualmente quilladas, los bordes membranosos, lígulas membranosas, cilioladas de 0.2 a 0.3 mm de largo, a veces vilosas en el dorso, láminas de 0.5 a 6.5 cm de largo por 1 a 3.5 mm de ancho, aplanadas, en ocasiones dobladas, escabriúsculas (poco ásperas), generalmente vilosas detrás de la lígula y en los márgenes inferiores, ocasionalmente en ambas superficies (Rzedowski, 2001). Durante la Inflorescencia desarrolla espigas 4 a 6, de 1.5 a 6 cm de largo, distribuidas en un verticilo, usualmente radiadas. A su vez desarrolla espiguillas de 2 a 2.8 mm de largo, adpresas en el raquis e imbricadas, verde violáceas, glumas de 1 a 2.3 mm de largo, glabras, la primera falcada (en forma de hoz), la segunda lanceolada; lema de 2 a 2.6 mm de largo, fuertemente doblada y aquillada, sin arista u ocasionalmente con un corto mucrón, pálea glabra tan larga o un poco más corta que la lema; raquilla prolongada, desnuda o llevando una segunda flor masculina o rudimentaria. (Rzedowski, 2001). Desarrolla un fruto de perfil fusiforme a elíptico, de 0.9 a 1.5 mm de largo y 0.5 a 0.7 mm de ancho, cuerpo translúcido de color ambarino o cremoso, de textura estriada extremadamente fina (Espinosa y Sarukhán, 1997). Lo que aparece como plántula es en realidad el primer brote de un estolón. La primer hoja del brote con vaina de 2 a 5 mm de largo, sin pelos; lígula sin pelos; lámina linear de 3 a 8 mm de largo y 1 a 1.3 mm de ancho, sin pelos; la segunda hoja siempre de ápice agudo, de 14 a 15 mm de largo y 0.7 a 1.2 mm de ancho, desarrolla una raíz como estolones y rizomas (Espinosa y Sarukhán, 1997).



Figura 4. *Cynodon dactylon*

Clasificación Taxonómica (Villaseñor y Espinoza 1998)

Plantae

 Magnoliophyta

 Liliopsida

 Poales

 Poaceae

 Chloridoideae

 Cynodonteae

 Cynodon

 C. dactylon

Fitoquímica

Se ha descrito varios principios activos entre los que se destacan, sales potásicas, fructosanas: triticina; inositol así como una gran variedad de taninos y flavonoides. (Rzedowski, 2001).

Usos en Medicina Tradicional

Es usado como diurético, colagogo, hepatoprotector, antiinflamatorio. Popularmente se considera depurativo, antihipertensivo e hipoglucemiante. Indicado para estados en los que se requiera un aumento de la diuresis: afecciones genitourinarias (cistitis, ureteritis, uretritis, oliguria, urolitiasis), hiperazoemia, hiperuricemia, gota, hipertensión arterial, edema, sobrepeso acompañado de retención de líquidos, disquinesias biliares, colecistitis y hepatitis. Está contraindicada con el uso de diuréticos en presencia de hipertensión o cardiopatías, sólo debe hacerse por prescripción y bajo control médico, dada la posibilidad de aparición de una descompensación tensional o, si la eliminación de potasio es considerable, una potenciación del efecto de los cardiotónicos. Popularmente se considera como abortiva. Las partes aéreas contienen heterósidos cianogénicos, responsables de intoxicaciones en ganadería (Espinosa y Sarukhán, 1997).

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar, área de trabajo y periodo de estudio

El proyecto de investigación se realizó en los laboratorios de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, en los laboratorios del Departamento de Biología Celular y Ultra-estructura del Centro de Investigación Biomédica de la UA de C, en los laboratorios del departamento Investigación de Productos naturales de la UJED campus Gómez Palacio y en el bioterio de la facultad de Medicina de la UA de C campus Torreón en un periodo comprendido de Agosto del 2010 a Julio del 2013.

5.2 Material biológico

5.2.1 Vegetal

Cynodon dactylon, *Lippia graveolens*, *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica* y lugares de colecta:

5.2.2 Huevecillos de *Artemia salina*

Para el bioensayo de letalidad de *A. salina*, se adquirieron huevecillos en Estados Unidos (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC)

5.2.3 Animales de experimentación

Las ratas macho *Wistar* fueron adquiridas a la empresa Harlam, Laboratories, SA de CV, y fueron alojadas en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila. La edad de los animales fue seleccionada de acuerdo a los eventos de maduración en el ciclo reproductivo de la rata (Sharp y La Regina. 1998).

Para cumplir con los lineamientos internacionales sobre el uso adecuado de los animales de experimentación, el protocolo de investigación fue sometido al comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila y aprobado de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.

5.2.4 Ubicación del área de colecta

Tabla 1. Ubicación geográfica de las especies recolectadas

Especie vegetal	Coordenadas geográficas	Ubicación
<i>Cynodon dactylon</i>	Latitud 25.38°, Longitud 103.31°	Poblado Transporte, ubicado en el estado de Durango.
<i>Lippia graveolens</i>	Latitud 25.497938°, Longitud 103.608735°	Ciudad Juárez, ubicado en el estado de Durango.
<i>Tagetes lucida</i>	Latitud 24.9°, Longitud 104.067°	Poblado Yerbanís, ubicado en la región del semidesierto Chihuahuense, en el Estado de Durango, al Norte de México
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Latitud 25.894259°, Longitud 103.602911°	Instalaciones de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, en Bermejillo, Durango.

Un ejemplar de cada especie fue montado en prensa botánica y se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para su identificación.

5.3 Metodología

5.3.1 Colecta de las plantas en estudio:

Las partes aéreas de las plantas de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens*, *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica* fueron recolectadas de diferentes lugares, ubicado en la región del semidesierto Chihuahuense, en el estado de Durango, al Norte de México (Tabla I).

Un ejemplar de cada especie fue montado en prensa botánica y se depositó en el herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para su identificación.

5.3.2 Obtención de los extractos metanólicos de las plantas

El material vegetal se colocó en un desecador con aireación por un periodo de cinco días a 45 ° C, una vez seco se molió en un molino mecánico (Wiley) obteniendo un polvo fino (Navarro y Rojas, 2006).

Para la obtención de los extractos metanólicos se pesaron en una balanza analítica (Ohaus) 30 g de material vegetal seco triturado y se adicionaron 300 mL de metanol (CTR Scientific) grado reactivo en un matraz Erlenmeyer, se tapó con papel parafilm y se agitó a baja velocidad en un agitador (Dual Action Shaker Lab-Line) y temperatura ambiente por 24 h, el macerado se filtró en papel filtro (Whatman International LTD. England) de poro grueso en matraz kitazato con bomba de vacío (Auto Science), repitiendo el proceso tres veces utilizando la misma cantidad de solvente nuevo en cada ocasión. El filtrado del macerado se destiló en un Rotaevaporador (LEV211-V) para separar el solvente, el extracto crudo se llevó a sequedad completa en una estufa de aire caliente (Riossa) a temperatura menor a 50° C. Los extractos secos se almacenaron en refrigeración a 4° C en frasco ámbar hasta su utilización. (Navarro y Rojas 2006; Nostro y Germano, 2000).

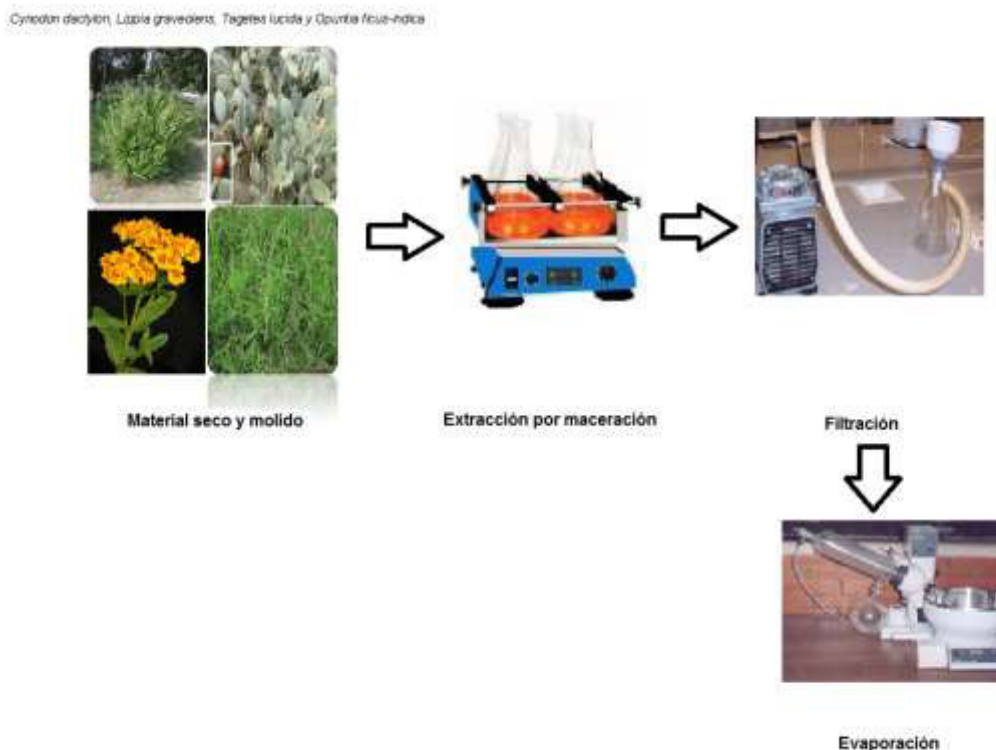


Figura 5. Diagrama de la obtención de los extractos metanólicos

5.3.3 Análisis fitoquímico preliminar para identificación parcial de los componentes de los extractos

Detección de cumarinas

Se añade 1 mL de solución metanólica del extracto en un tubo de ensayo, el cual se cubre con un trozo de papel filtro previamente impregnado con una solución diluida de KOH. Se calienta al baño maría durante 10-15 min. La presencia de cumarinas volátiles se pone de manifiesto por la fluorescencia azulada del papel de filtro a la luz UV. (Galisteo Moya, 1997).

Detección de flavonoides

A 1 mL del extracto se le adiciona 2 ó 3 gotas de HCl concentrado y un fragmento de cinta de magnesio. Dependiendo del tipo de flavonoide presente aparecerá una coloración diferente (Galisteo Moya. 1997)

- Anaranjado » Flavonas
- Rojo » Flavanonas
- Rojo Azulado » Flavonoles
- Violeta » Flavonoles y xantonas

Detección de antocianinas

A 1 mL de extracto se le adicionan 2 mL de HCl al 37% QP. Se calienta al baño maría durante 30 min con objeto de producir la hidrólisis de los heterósidos. Una vez transcurrida la reacción se enfría el tubo y se le añade alcohol isoamílico, agitando vigorosamente para favorecer la extracción de las geninas. La aparición de color rojo en la fase alcohólica confirma la existencia de antocianos. (Galisteo Moya, 1997)

Detección de taninos

Se añade a 1 mL del extracto, 2 ó 3 gotas de solución acuosa de Cl_3Fe al 1 % de formaldehído, hirviéndose durante varios minutos. La aparición de un precipitado indicaría la presencia de taninos catéquicos. Se filtra y si al añadir unas gotas de Cl_3Fe al 1 %, aparece un color azul, indicaría la presencia de taninos pirogálicos (Ali Tahir, 1991).

Detección de antraquinonas

Se determina mediante la reacción de Bornträger. A 1 mL de extracto se le añade 1 mL de NaOH 1N, agitando para que se mezclen las fases. Tras dejar en reposo la reacción es positiva si en la fase acuosa aparece una coloración rojiza debida a las sales de los compuestos 1,8- dihidroxiantraquinonicos. (Galisteo Moya, 1997)

Detección de Terpenos y Esteroides

Estos grupos fitoquímicos se ensayan mediante la reacción de Liebermann-Burchard. Se parte de 1 mL del extracto, al que se le adiciona 1 mL de anhídrido acético y 0.5 mL de H₂SO₄ concentrado dejándolo resbalar suavemente por las paredes del tubo. La presencia de un anillo rojizo en la interfase es indicativa de la existencia de triterpenos y siendo característica de los esteroides la coloración verdosa en fase superior (Galiste Moya. 1997)

Detección de saponinas

Este ensayo se basa en el poder afrógeno de estos compuestos. Para detectarlas se realiza una redisolución del residuo seco al 10 % en agua a ebullición y se deja enfriar. Se agita vigorosamente durante 1 min, en tubos de ensayo de 15 mm de diámetro exterior, con la consiguiente formación de espuma. La reacción se considera positiva cuando dicha espuma persiste transcurridos 30 min (± 1 min) (Miró, 1981; Galisteo Moya, 1997).

Detección de alcaloides

Se ensayan de manera independiente sobre 1 mL del extracto, dando lugar a precipitados de distinta coloración:

- Reactivo de Bouchardat » precipitado rojo ladrillo
- Reactivo de Mayer » precipitado blanco amarillento
- Reactivo de Hager » precipitado amarillo limón
- Reactivo de Dragendorff » precipitado castaño rojizo

5.3.4 Toxicidad de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre *Artemia salina*

Se valoró la actividad tóxica de los extractos metanólicos de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens*, *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica* con nauplios de *Artemia salina* por el método descrito por Meyer *et al.*, (1982), modificado por Molina-Salinas y Said-Fernández (2006). Para la eclosión de los huevecillos de *A. salina*, se colocaron en agua de mar artificial (40 g de sal de agua de mar (Instant Ocean®, Acuarium System), 0.006 g de levadura de cerveza (Mead Johnson). Se aforaron en un litro de agua bidestilada (Quimicrón). Se pesaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) y se depositaron en un recipiente de vidrio de color negro dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm, con 100 mL de agua de mar artificial, se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se iluminó con una lámpara de 20 watts de luz blanca. Después de 48 h de incubación se tomaron 10 nauplios con micropipeta (LabMate Soft) para transferirlos a una microplaca de 96 pozos, se adicionaron 100 μ L de la suspensión de nauplios/pozo más 100 μ L de las diluciones de los extractos diluidos en agua de mar. Se utilizaron 50, 100, 250, 500 y 1000 μ g mL⁻¹ de extracto en cinco repeticiones. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio a concentración de 400 ppm (Vega-Menchaca *et al.*, 2013)

y agua de mar como control negativo. Después de 24 h y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Labomed), se contaron los nauplios vivos y muertos por concentración, y se calculó la Dosis letal media (DL₅₀) del extracto utilizando el método estadístico Probit de Finney (Anderson *et al.*, 1991).

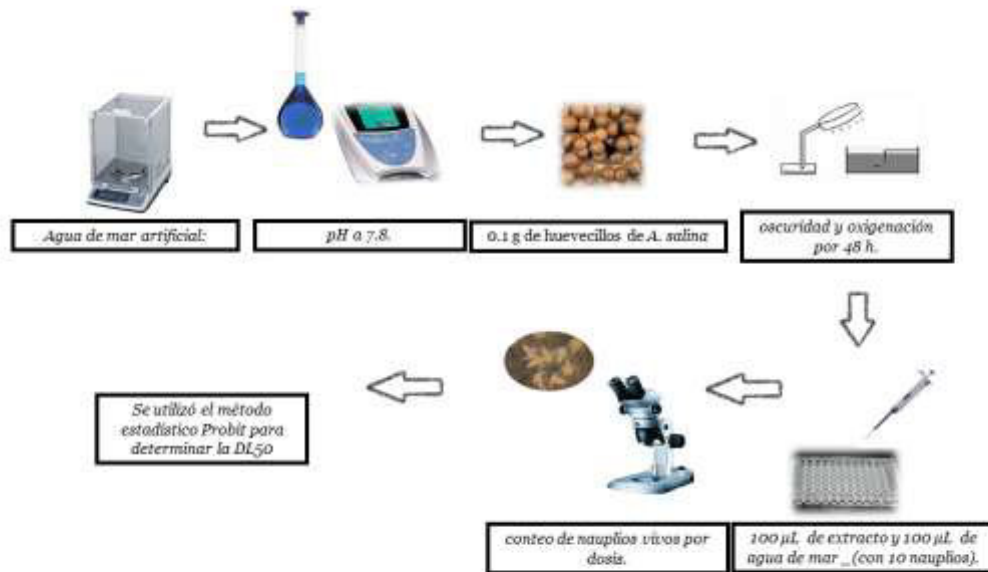


Figura 6. Diagrama del ensayo de letalidad de los extractos sobre *Artemia salina* en microplaca

5.3.5 Diseño experimental

Los animales fueron divididos en seis grupos

Grupo I (*Tagetes lucida*): cinco animales administrados con 50 mg/kg de extracto metanólico de *T. lucida* en un mL de vehículo (agua destilada estéril) por vía oral durante un periodo de 45 d.

Grupo II (*Cynodon dactylon*): cinco animales administrados con 50 mg/kg de extracto metanólico de *C. dactylon* en un mL de vehículo (agua destilada estéril) por vía oral durante un periodo de 45 d.

Grupo III (*Lippia graveolens*): cinco animales administrados con 50 mg/kg de extracto metanólico de *L. graveolens* en un mL de vehículo (agua destilada estéril) por vía oral durante un periodo de 45 d.

Grupo IV (*Opuntia ficus-indica*): cinco animales administrados con 50 mg/kg de extracto metanólico de *O. ficus-indica* en un mL de vehículo (agua destilada estéril) por vía oral durante un periodo de 45 d.

Grupo V (Grupo control negativo) cinco animales fueron administrados con agua destilada estéril por vía oral durante un periodo de 45 d.

Grupo VI (Grupo control positivo): cinco animales fueron administrados con 50 mg/kg de Undecanoato de testosterona diluido con aceite de oliva extra virgen estéril por vía intramuscular en una única dosis a la par del inicio de la administración de los grupos.

5.3.6 Evaluación de los niveles séricos de Testosterona en ratas macho

Wistar

Transcurridos los 45 d de administración oral de los extractos y controles, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se extrajo 1 mL de sangre por punción cardíaca, se obtuvo el suero sanguíneo dejando coagular la muestra durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó por 20 min a 1000 rpm. Se removió el suero inmediatamente y se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

Se analizaron las muestras de suero en kits comerciales de ELISA para la hormona Testosterona (T) en suero de rata. Primero se añade el estándar y la muestra a los pocillos pre-recubiertas con un anticuerpo Testosterona para rata, al mismo tiempo añadir segundo anticuerpo conjugado con HRP Testosterona para rata, incubar y posteriormente lavar para eliminar sustancia no ligadas. Finalmente, se añaden sustratos HRP, se incubaron durante la detección, y un color azul es desarrollado. Las reacciones se detiene y el color se vuelve amarillo cuando la solución de STOP se añade. La intensidad del color amarillo

se correlaciona proporcionalmente con la concentración de la hormona Testosterona de las muestras.

Nota: La determinación de la testosterona se llevó a cabo con Kits comerciales de ELISA (NovaTein Biosciences) según el protocolo y la lectura de las placas por medio de un lector de ELISA modelo WH100 (NovaTein Biosciences).

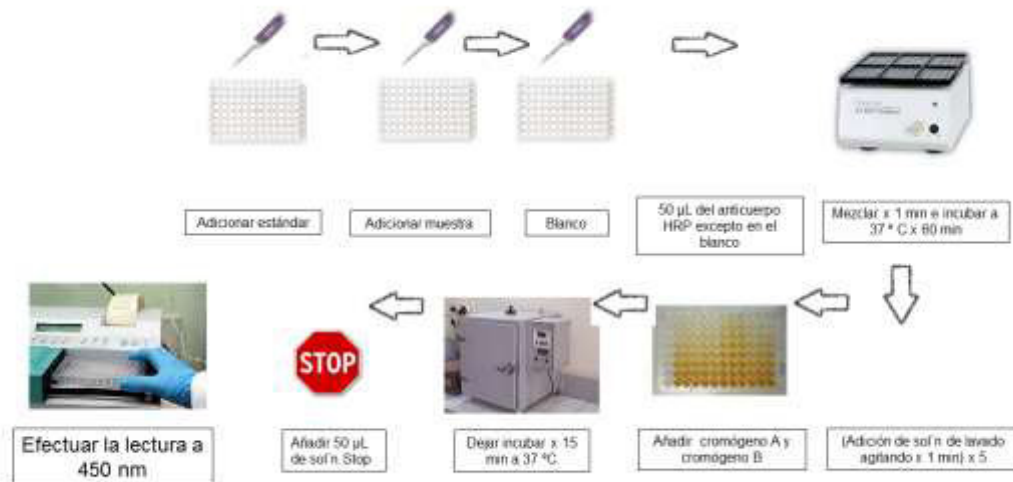


Figura 7. Diagrama de la evaluación de los niveles séricos de Testosterona con Kits comerciales de ELISA

5.3.7 Evaluación de los parámetros de Calidad espermática en ratas macho *Wistar*

Se efectuó una incisión abdominal a las ratas Wistar con la retracción del escroto cortando los testículos y epidídimos, se separó el epidídimo del testículo quitando el tejido adiposo que los rodea, a los testículos libres de tejido adiposo se les peso con una balanza analítica y se midieron con un vernier digital, así mismo los epidídimos libres de tejido adiposo fueron pesados.

De la región más caudal de los epidídimos y los conductos deferentes se obtuvo el semen colocándolos en una placa de Petri con 2 mL de solución de NaCl al

0.9% a 4°C. Con una aguja 30G se realizaron diversas incisiones a fin de facilitar la dispersión del esperma.

Se determinó la concentración espermática en cámara de Neubauer siguiendo el procedimiento utilizado para el conteo de glóbulos rojos, la cantidad de espermatozoides por macho se expresó en millones mililitro⁻¹ de suspensión.

La morfología se evaluó en alícuotas de suspensión fijadas en formol y extendida en un portaobjetos, las que se tiñeron con eosina y se examinaron bajo microscopio óptico a 1000 aumentos. Por cada macho se analizaron 100 espermatozoides identificando normales y no normales (De la Cruz *et al.*, 2004; Sobarzo y Bustos-Obregon, 2000).

Las células consideradas morfológicamente anormales fueron aquellas que presentaron cabeza triangular, colapsada o en martillo, presencia de curvatura a nivel de la pieza intermedia, cola rectilínea o con curvatura (en distintos grados) tanto en la porción media como distal de la misma (Kawai *et al.*, 2006).

Los parámetros de motilidad de los espermatozoides se valoraron a partir del semen obtenido de las ratas conteniendo 1ml de medio HOLDING Plus (BIONICHE, Pullman, WA, USA) y la dispersión del esperma se facilitó practicando varias incisiones con una aguja 30G. Las placas con el material detallado se mantuvieron a 37° C en baño maría por 10 min. Se cargó una alícuota de cada muestra en una cámara de Makler de 20 mL y se observaron 6 campos.

5.3.8 Electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa)

Se evaluaron 5x10⁵ espermatozoides mL⁻¹ ajustados y suspendidos en agarosa (CONDA) de bajo punto de fusión al 0.5% en láminas portaobjetos pre-tratadas con 100 µL de agarosa de punto de fusión normal (CONDA) al 0.5%, se incubaron 10 min a temperatura ambiente, los portaobjetos se colocaron en solución de lisis número 1 (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10% DMSO y 1% de Triton X 100) a un pH 10.0 a 4 °C durante 4 h. Posteriormente, los portaobjetos se depositaron en solución de lisis número 2 (2.5M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, 200 µg/mL de proteinasa K y 300 mM de DTT) con pH 7.4, a 37.5 °C durante 18 h. Terminada la lisis número 2, se incubaron en tampón de

electroforesis (NaOH 0.3 M, EDTA 200 mM) a pH 13.0 a 4 °C durante 10 min en cuarto oscuro. Luego se realizó una corrida electroforética a 25 V y 100 mA/10 min. Se lavaron los portaobjetos con tampón neutralizante (0.4 M Tris-HCl; pH 7.5) y se deshidrataron con metanol puro. Una vez secas se sometieron a tinción con gel green (biotium) 35 µL a 4X, se observó en microscopio de fluorescencia (Labomed LX-400) a 40X.

Se analizaron 100 células por cada rata y se clasificaron por niveles de migración: ninguna, corta, media, larga y muy larga. A estos niveles se les asignaron valores numéricos (0, 1, 2, 3 y 4).

Se analizan las unidades arbitrarias según Collins en el 2004.

$$UA= 0 \times TCG0 + 1 \times TCG1 + 2 \times TCG2 + 3 \times TCG3 + 4 \times TCG4.$$

0TCG0= Total de células grado 0

1TCG1= Total de células grado 1

2TCG2= Total de células grado 2

3TCG3= Total de células grado 3

4TCG4= Total de células grado 4

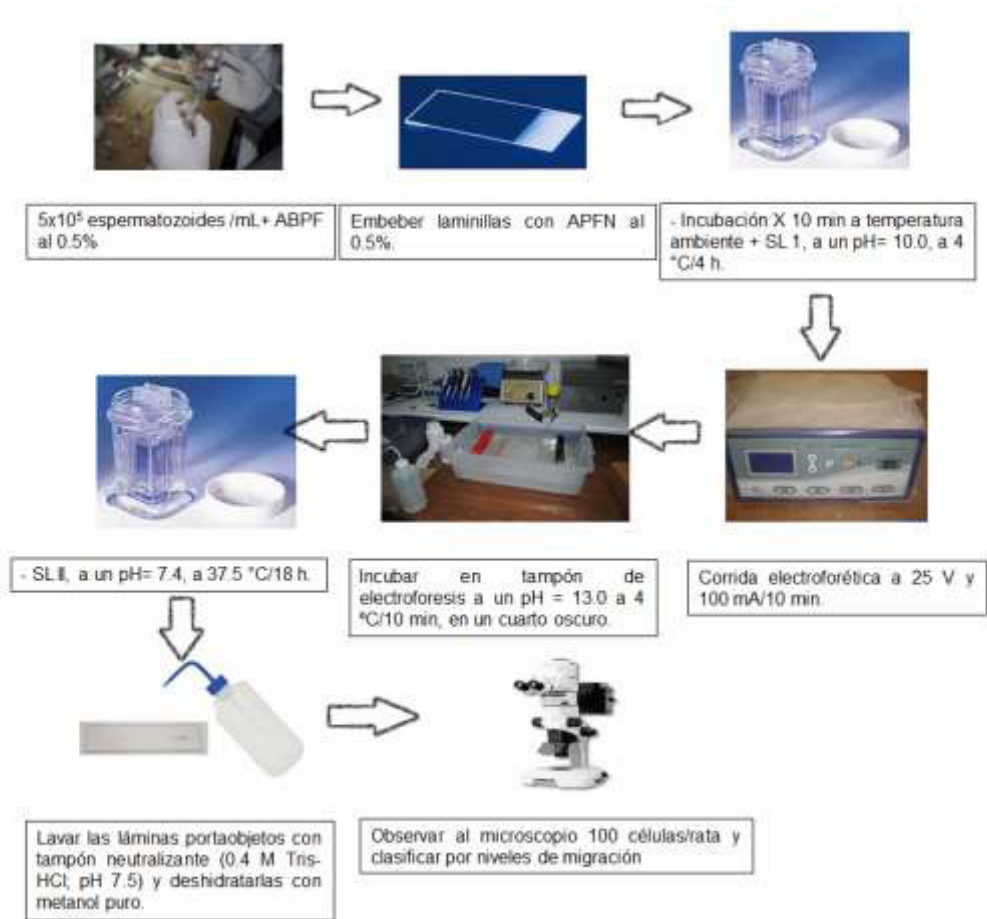


Figura 8. Diagrama de la electroforesis en gel de células individuales (ensayo cometa)

5.3.9 Evaluación histológica de testículo de rata macho *Wistar*

Después de haber sido pesados y medidos los testículos se colocaron en Formaldehido al 10 % como fijador de la muestra. Una vez que las muestras de órganos fueron fijadas, se colocaron en los cassetes apropiados y etiquetados, luego se lavó en agua corriente durante varios minutos con la finalidad de retirar el exceso de fijador que tuviera el material y finalmente se enjuago brevemente en agua destilada. Posterior a esto se llevó a cabo la deshidratación, para lo

cual se somete al material a inmersiones progresivas de soluciones etanólicas graduales, es decir alcoholes que van de menor a mayor concentración (60%, 70%, 80%, 96% y 100%). En cada una de las concentraciones etanólicas el tiempo de estancia en las mismas fue de 1 h. Una vez terminado el proceso de deshidratación se procedió con el aclaramiento empleando xileno por una hora. Se llevó a cabo una preinclusión de parafina para darle una solidez o firmeza al tejido para posteriormente llevarlo a una inclusión definitiva en moldes de plástico, sirviendo un poco de parafina líquida, luego se colocó y oriento la muestra de tejido, después se cubrió totalmente con parafina. Una vez solidificado se colocó el bloque en la prensa portabloque del micrótomo y se sujetó a presión obteniendo cortes de 5 μm de espesor.

Se extendieron los cortes haciéndolos flotar en agua caliente (40-45°C), una vez extendidos se procedió a colocarlos sobre los portaobjetos para posteriormente desparafinizar al introducirlos en un horno durante 10 min de 45 a 50 °C para sumergirlos en dos baños de xilol por 5 min cada uno. Para llevar a cabo la tinción se tuvo que volver a hidratar los tejidos colocándolos en una mezcla de xilol-etanol absoluto (1:1) durante 5 min, luego se sumergieron en etanol puro por 2 min y posteriormente a otro recipiente que contenga alcohol de 96% por 2 min y finalmente a un recipiente que contiene agua destilada. La muestra rehidratada se sometió a una tinción de hematoxilina-eosina.

5.3.10 Particiones del extracto crudo de *Opuntia ficus-indica* con solventes de distintas polaridades

Por ser el extracto que presento mayor bioactividad de los cuatro extractos se procedió a realizar la partición del mismo sometándolo a calentamiento en un vaso de precipitado con 50 mL de hexano agitándolo constantemente hasta su punto de ebullición de 50 °C durante aproximadamente 5 min, posterior al calentamiento se filtró lo soluble en hexano y se llevó al rota-evaporador, con lo insoluble en hexano se vuelve a repetir este procedimiento hasta que el líquido quede lo más claro posible. Una vez que se obtuvo el mayor contenido de

compuestos solubles en hexano a la parte que no se solubilizo con hexano se le adicionarán 50 mL de cloroformo repitiendo el mismo procedimiento que con el hexano, obteniendo de esta manera los rendimientos de las siguientes particiones:

Soluble en hexano

Soluble en cloroformo

Insoluble en cloroformo

Análisis de bioactividad de las particiones del extracto de *Opuntia ficus-indica*

Para probar la bioactividad de las particiones soluble en hexano, soluble en cloroformo e insoluble en cloroformo se realizó un diseño experimental similar al ya mencionado anteriormente, en este caso cada grupo fue de 6 ratas, a las cuales se sometieron a los mismos procedimientos ya descritos anteriormente para evaluar motilidad espermática, viabilidad espermática, densidad espermática, niveles de testosterona en suero, electroforesis en gel de células espermáticas y cortes histológicos de testículo.

5.3.11 Identificación de compuestos presentes en las fracciones activas, por cromatografía de gases acoplado a masas.

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado con un detector de espectro de masas (GC-MS) para identificar los compuestos de las fracciones con efecto inhibitorio sobre la espermatogénesis. El análisis se realizó en un equipo HP19091J-433 (Hewlett Packard®, Abonadle, PA.) GC-MS Agilent 5973 utilizando columnas HP 5.

6.- RESULTADOS

Las especies seleccionadas para este estudio fueron elegidas en base a estudios previos sobre la actividad biológica, aplicación etnofarmacológica y por su distribución en la Región de la Comarca Lagunera de Durango, al Norte de México.

El herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en base a los especímenes entregados de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens* H.B.K., *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica*, extendió los Bouchers # 009, 010, 011 y 012/2012 respectivamente.

En la tabla 2 se muestran los rendimientos de los extractos metanólicos de las especies vegetales en estudio procesadas por maceración Observándose el menor rendimiento en *Cynodon dactylon* y el mayor rendimiento en *Lippia graveolens*.

Tabla 2. Rendimiento de las plantas secas en estudio procesadas por maceración en metanol

Especie vegetal	% de rendimiento del extracto metanólico crudo
<i>Cynodon dactylon</i>	2.29
<i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	18.76
<i>Tagetes lucida</i>	10.72
<i>Opuntia ficus-indica</i>	6.12

6.1 Análisis fitoquímico preliminar para identificación parcial de los componentes de los extractos de las plantas en estudio

6.1.1 Identificación por medio de reacciones químicas

En la tabla III se muestran los resultados del análisis fitoquímico de los extractos metanólicos para la identificación parcial de los grupos funcionales observándose que las cuatro plantas de estudio presentan esteroides en su

contenido, así mismo presentan cumarinas salvo *Tagetes lucida*, en el caso de antocioninas la planta que no presenta este grupo funcional es *Cynodon dactylon*.

Tabla 3. Análisis fitoquímico para la identificación de los grupos funcionales presentes en los extractos metanólicos de la plantas en estudio.

Grupos funcionales	<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Lippia graveolens</i>	<i>Opuntia ficus indica</i>	<i>Tagetes lucida</i>
Cumarinas	+	+	+	-
Terpenos	-	-	-	-
Esteroides	+	+	+	+
Antraquinonas	+	+	-	-
Saponinas	+	-	+	+
Antocianinas	-	+	+	+
Taninos				
Catequicos	-	-	-	-
Pirogálicos	-	-	+	+
Alcaloides				
Reactivo de Bouchardat	-	-	-	-
Reactivo de Mayer	-	-	-	-
Reactivo de Hager	-	-	-	-
Reactivo de Dragendorff	+	+	-	+
Flavonoides				
Flavonas	+	+	+	+
Flavanonas	-	-	-	-
Flavonoles	-	-	-	-
Flavonoles y xantonas	-	-	-	-

6.2 Toxicidad de los extractos metanólico de las plantas en estudio sobre *Artemia salina*

Se valoró la actividad tóxica de los extractos metanólicos de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens*, *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica* con nauplios de *A. salina* por el método descrito por Meyer *et al.*, (1982), modificado por Molina-Salinas y Said-Fernández (2006) por ser sencillo y económico en la búsqueda primaria de toxicidad en extractos crudos de plantas y organismos marinos. En la tabla IV se muestran los resultados del análisis PROBIT realizado en base a los organismos vivos y muertos obtenidos al someterlo con los extractos metanólicos crudos de las plantas en estudio. Según los criterios de Lagarto Parra y Col, 2001 los extractos de *Lippia graveolens* y *Tagetes lucida* pueden presentar compuestos biológicamente activos y los extractos de *Cynodon dactylon* y *Opuntia ficus-indica* son considerados no tóxicos.

Tabla 4. Actividad tóxica de los extractos metanólicos de las plantas en estudio sobre *Artemia salina*

Especie Vegetal	DL ₅₀ µg/mL
<i>Lippia graveolens</i>	247.87
<i>Cynodon dactylon</i>	>1000
<i>Tagetes lucida</i>	454.02
<i>Opuntia ficus-indica</i>	>1000

Los resultados relevantes se presentan en *L. graveolens* y *T. lucida* con una DL₅₀ de 247.87 y 454.02 µg/mL respectivamente. Determinado por el método PROBIT.

6.3 Tratamiento por vía oral a ratas macho *Wistar* de los extractos metanólicos de las plantas en estudio

Durante el periodo de acondicionamiento y tratamiento de las ratas se llevó a cabo el control de peso corporal de los animales en estudio: Grupo I. *T. lucida*, Grupo II. *C. dactylon*. Grupo III. *L. graveolens*, Grupo IV. *O. ficus-indica* Grupo

V. Control negativo y Grupo VI. Control positivo (Tabla V), observándose que en el grupo tratado con *Opuntia ficus-indica* disminuyo considerablemente el peso promedio de la rata con respecto al resto de los grupos.

Tabla 5. Peso corporal promedio de los animales en estudio en diversos intervalos de tiempo

Grupo	Periodo de tiempo						
	1	2	3	4	5	6	7
I	152.6	238.0	270.6	286.6	310.7	328.0	362.4
II	187.6	234.7	266.4	287.3	311.1	327.6	345.0
III	188.5	244.0	266.4	283.1	302.8	317.6	351.6
IV	181.1	232.6	264.6	280.2	298.5	309.2	336.4
V	142.8	225.7	261.6	283.5	305.0	321.4	349.2
VI	170.0	246.4	280.6	295.2	318.34	331.4	360.8

Grupo I. *T. lucida*, Grupo II. *C. dactilon*, Grupo III. *L. graveolens*, Grupo IV. *O. ficus-indica*, Grupo V. Control negativo y Grupo VI. Control positivo. Cada periodo de tiempo equivale a 7 d excepto el periodo 7 el cual es equivalente a 3 d con un total de 45 d de exposición a controles y tratamientos. (n=5)

6.3.1 Evaluación de los niveles séricos de Testosterona en ratas macho *Wistar*

Se evaluaron los niveles séricos de testosterona en todos los grupos de experimentación con ratas macho *Wistar* después de 45 d de tratamiento (Tabla VI). Los resultados mostraron en el caso de *Opuntia ficus-indica* una disminución de los niveles séricos de testosterona en los animales de experimentación con respecto al grupo control negativo y positivo. *Tagetes lucida* fue el grupo que presento los niveles de testosterona más altos con respecto al control negativo.

Tabla 6. Promedio de niveles séricos de testosterona en ratas macho Wistar

Grupo	Niveles de testosterona en suero (ng/mL)
I	3.4
II	3.1
III	2.61
IV	1.133
V	3.012
VI	3.79

Grupo I. *T. lucida*, Grupo II. *C. dactilon*, Grupo III. *L. graveolens*, Grupo IV. *O. ficus-indica*, Grupo V. Control negativo y Grupo VI. Control positivo. (n = 5).

6.3.2 Evaluación de los parámetros de Calidad espermática en ratas macho Wistar

En la tabla VII se muestra los resultados de la evaluación de la calidad espermática que incluyen la concentración espermática, motilidad, viabilidad; estos son parámetros andrológicos que son evaluados para determinar la fertilidad de un sujeto masculino. En el grupo de *Opuntia ficus-indica* se observa el mayor número de células muertas con una viabilidad de 31.8 %, también se observa una concentración espermática disminuida con respecto a los demás grupos de tratamientos y controles, con respecto a la motilidad de las células espermáticas de este grupo se aprecia una disminución de este parámetro de 28.6 % muy por debajo de los grupos tratados y controles.

Tabla 7. Evaluación de la densidad, motilidad, viabilidad de células espermáticas de ratas macho Wistar

Grupo	Motilidad espermática %	Densidad espermática millones/mL	Viabilidad espermática %
I	65 ± 7.68	15.80 ± 4.2	63.40 ± 8.5
II	63.8 ± 14.6	26 ± 8.09	60.6 ± 5.17
III	56.2 ± 9.88	21.20 ± 5.40	50.2 ± 8.25
IV	28.6 ± 5.45	10.8 ± 5.89	31.8 ± 6.30
V	78.20 ± 2.58	28.20 ± 9.44	75.60 ± 5.81
VI	60.80 ± 6.72	29.00 ± 5.56	48.00 ± 8.60

Grupo I. *T. lucida*, Grupo II. *C. dactilon*, Grupo III. *L. graveolens*, Grupo IV. *O. ficus-indica*, Grupo V. Control negativo y Grupo VI. Control positivo. (n = 5).

6.3.3 Peso y longitud de testículos y epidídimos de controles y tratamiento

En la tabla VIII se muestra los resultados de: pesos y longitudes de los testículos y el peso de los epidídimos de los grupos tratamiento y controles.

Se observa que los pesos de los testículos de las ratas administradas con el extracto de *Lippia graveolens* presentan un decremento en el peso con respecto a los demás grupos, así mismo este grupo presento una disminución en la longitud del testículo. En el caso del grupo de ratas administradas con el extracto de *Opuntia ficus-indica* se observa un incremento en el peso y longitud de los testículos.

Tabla 8. Medición del peso y longitud de testículos y epidídimos de ratas tratadas y controles.

Grupo	Peso Testículo I g	Peso Testículo II G	Longitud Testículo I cm	Longitud Testículo II cm	Peso epidídimo I g	Peso Epidídimo II g
I	1.46 ± 0.22	1.59 ± 0.13	2.04 ± 0.09	2.11 ± 0.09	0.7812 ± 0.06	0.7071 ± 0.21
II	1.54 ± 0.19	1.57 ± 0.19	1.98 ± 0.08	2.00 ± 0.1	0.96 ± 0.19	0.94 ± 0.24
III	1.44 ± 0.05	1.46 ± 0.05	1.99 ± 0.04	2.03 ± 0.04	0.74 ± 0.09	0.63 ± 0.08
IV	1.55 ± 0.08	1.56 ± 0.08	2.12 ± 0.05	2.10 ± 0.07	0.70 ± 0.09	0.74 ± 0.08
V	1.53 ± 0.12	1.55 ± 0.14	1.99 ± 0.15	1.97 ± 0.12	0.7647 ± 0.04	0.7657 ± 0.04
VI	1.51 ± 0.10	1.55 ± 0.16	1.91 ± 0.11	1.93 ± 0.15	0.6967 ± 0.06	0.6692 ± 0.05

Grupo I. *T. lucida*, Grupo II. *C. dactilon*, Grupo III. *L. graveolens*, Grupo IV. *O. ficus-indica*, Grupo V. Control negativo y Grupo VI. Control positivo. (n = 5).

6.3.4 Electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa)

Durante el desarrollo de este estudio no se observaron síntomas clínicos indicativos de toxicidad en ninguno de los tres grupos experimentales. Indicando que las dosis utilizadas en cada uno de estos no fueron tóxicas a nivel sistémico.

En la tabla IX se muestra los resultados obtenidos en 100 células de cada animal en el ensayo cometa, mostrando que el grupo de *Opuntia ficus-indica* es el que presenta mayor número de células dañadas en el nivel 4 con 349.20 UA siendo el grupo menos dañados el grupo control con células sin fraccionamiento de ADN.

Tabla 9 evaluación de los niveles de daño en células espermáticas de ratas macho Wistar en el ensayo cometa

Grupo	Nivel de daño					UA
	0	1	2	3	4	
I	12.6	25.4	47.6	7.4	7	170.8
II	1.80	2.80	6.20	43.80	45.40	328.20
III	1.60	9.20	48.00	34.20	7.60	238.20
IV	1.20	2.60	7.00	24.20	65.00	349.20
V	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
VI	3.00	3.40	6.60	26.80	61.40	342.60

Grupo I. *T. lucida*, Grupo II. *C. dactilon*, Grupo III. *L. graveolens*, Grupo IV. *O. ficus-indica*, Grupo V. Control negativo y Grupo VI. Control positivo. (n = 5).

Nivel de daño 0: Células no dañadas; **Nivel de daño 1:** mínima frecuencia de lesiones en el ADN; **Nivel de daño 2:** daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN; **Nivel de daño 3:** daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN; **Nivel de daño 4:** células totalmente dañadas con cometas visibles. UA= Unidades Arbitrarias

6.3.5 Evaluación histológica de testículo de rata macho *Wistar*

En la figura 9 se muestran las micrografías de un corte histológico de testículo de ratas Wistar, en el grupo de control negativo se observa una morfología normal con una elevada densidad de células espermáticas, no se observó vacuolización y se observaron límites celulares bien definidos y estructura de la apariencia histológica normal; en la figura b) se observa una inhibición de la espermatogénesis, daño generalizado en el tejido testicular, presencia de abundantes vacuolas, signos de necrosis y alteración de la arquitectura testicular normal caracterizada por la desorganización y amplias zonas carentes de células; mientras que en la figura c); se presenta una vacuolización en la región de los túbulos seminíferos, observándose amplias zonas carentes de células y disminución espermática; en la figura d, se aprecia una inhibición de la espermatogénesis, presencia de abundantes vacuolas, desorganización y amplias zonas carentes de células; en la figura e se observa una distribución similar que en la figura d, sin embargo en la última imagen se aprecia más marcada la ausencia de células espermáticas.

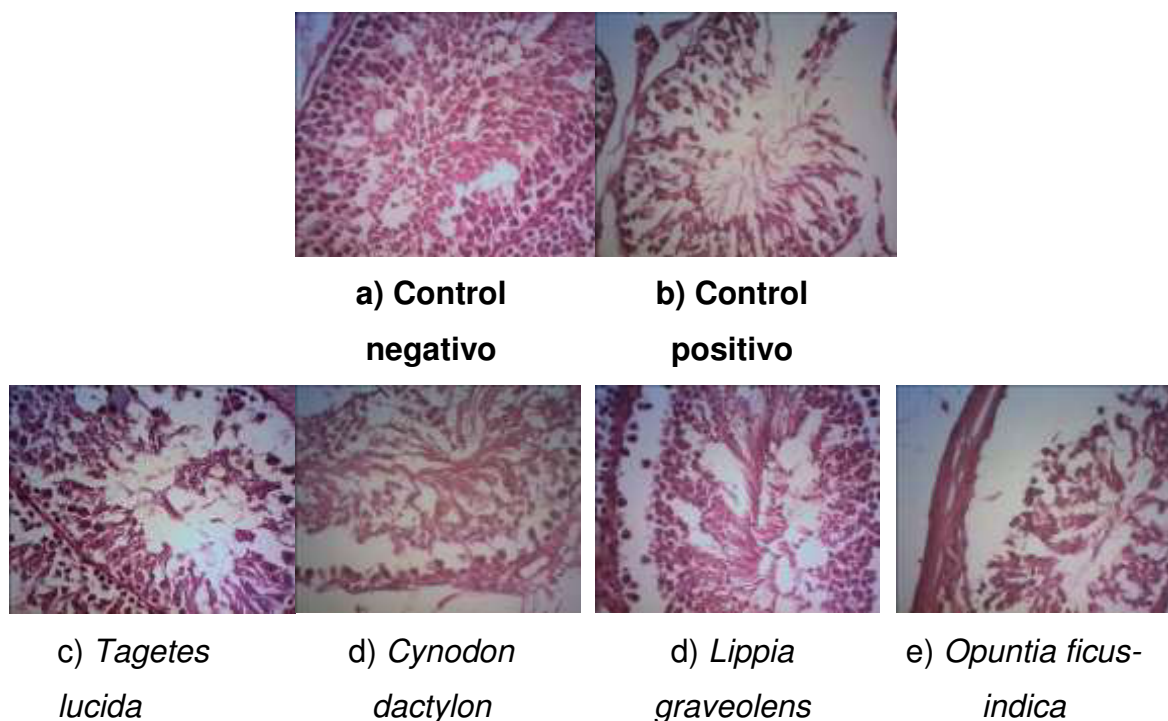


Figura 9. Micrografía de los cortes histológicos de testículos de ratas tratadas y controles

Evaluación de bioactividad sobre la reproducción de las particiones del extracto de *Opuntia ficus-indica* en ratas macho Wistar

El grupo de ratas macho tratado con el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* presento mayor actividad biológica sobre la reproducción, alterando considerablemente los parámetros de calidad espermática, así como ocasionando alteraciones en los testículos de ratas y niveles séricos de testosterona, también el análisis de células individuales por el ensayo cometa mostro alteraciones en el daño al material genético. En base a los resultados obtenidos se consideró realizar las particiones de este extracto con diferentes solventes para de esta manera someter las particiones obtenidas a un estudio de la actividad biológica sobre la reproducción para determinar la partición o particiones más bioactivas, resultando que la partición realizada con el solvente de cloroformo presenta mayor alteración en la viabilidad y motilidad espermática

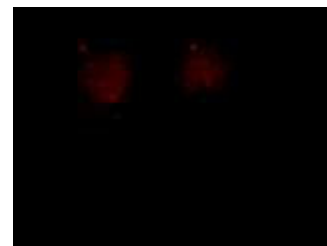
(tabla X), concentración de testosterona (tabla X), en este grupo se ven disminuidas con respecto a los demás grupos, se observan mayor migración del material genético de células espermáticas (figura 10 y tabla XI), así mismo los cortes histológicos presentan abundantes vacuolas, desorganización y amplias zonas carentes de células (figura 11).

Tabla 10. Evaluación de los niveles séricos de testosterona y calidad espermática en ratas tratadas con las particiones del extracto de *Opuntia ficus-indica*

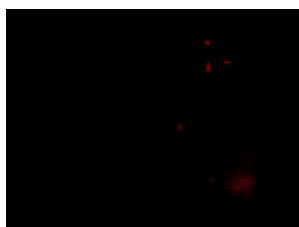
Grupo	Testosterona ng/mL	Motilidad espermática %	Densidad espermática mil/lmL	Viabilidad espermática %
1 Insoluble en cloroformo	4.29	52.83	11.13	53.16
2 Soluble en hexano	3.72	56.6	19.06	58.83
3 Soluble en cloroformo	1.94	37.33	27.28	39.83
Control negativo	3.012	78.20	28.20	75.60
Control positivo	3.79	60.80	29.00	48



Control negativo

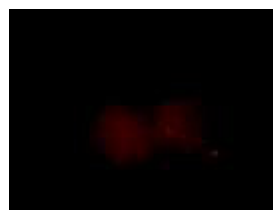


Control positivo



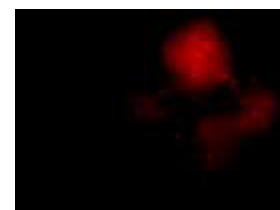
Grupo 1

Insoluble cloroformo



Grupo 2

Soluble hexano



Grupo 3

Soluble cloroformo

Figura 10. Micrografía de los niveles de daño en células espermáticas de ratas tratadas con las particiones de *Opuntia ficus-indica*

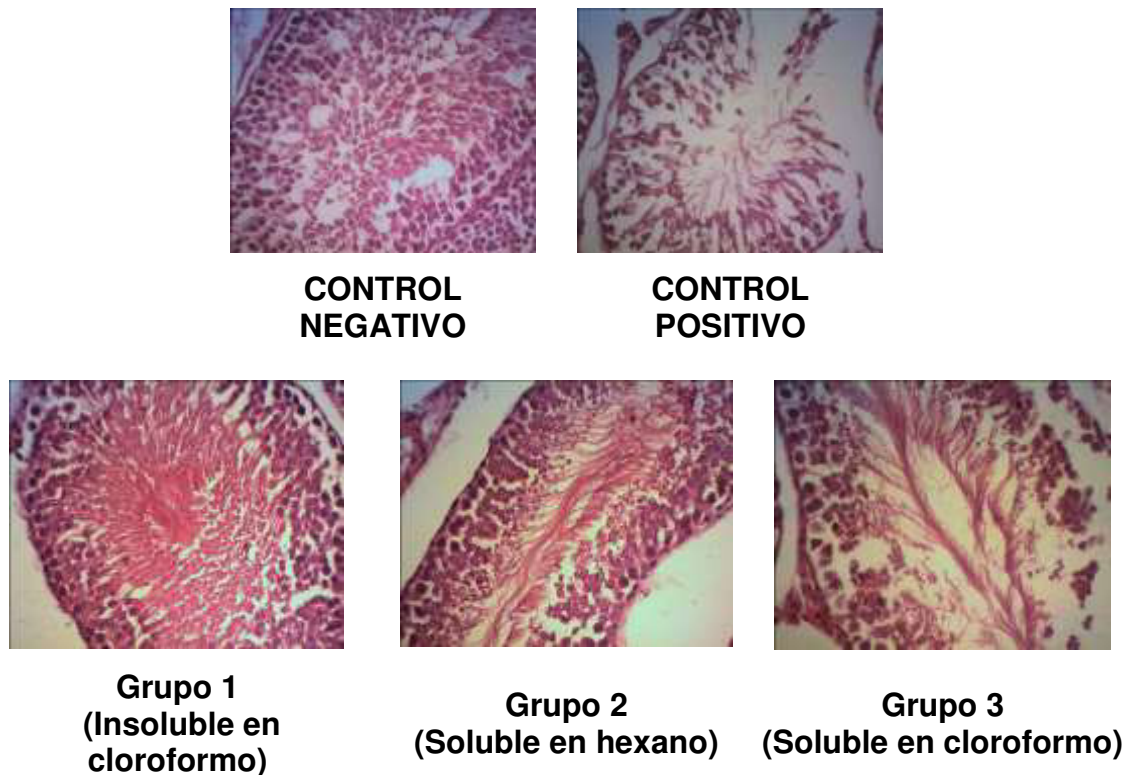


Figura 11. Micrografía de los cortes histológicos de testículos de ratas tratadas con las particiones del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*

En el tejido del grupo control negativo se observó una elevada densidad de células espermáticas, no se observó vacuolización y se observaron límites celulares bien definidos y estructura de la apariencia histológica normal; en el control positivo se presentó inhibición de la espermatogénesis, daño generalizado en el tejido testicular, presencia de abundantes vacuolas, signos de necrosis y alteración de la arquitectura testicular normal caracterizada por la desorganización y amplias zonas carentes de células; grupo 1 (insoluble en cloroformo): vacuolización en la región de los túbulos seminíferos, observándose amplias zonas carentes de células y disminución espermática; grupo 2 (soluble en hexano): inhibición de la espermatogénesis, presencia de

abundantes vacuolas, desorganización y amplias zonas carentes de células; en el grupo 3 (soluble en cloroformo) se acentúa el daño a la morfología testicular disminuyendo las células precursoras ocasionando disminución en las células espermáticas.

6.4.1 Particiones del extracto crudo de *Opuntia ficus-indica* con solventes de distintas polaridades

En la tabla XI se muestra el rendimiento de las particiones realizadas al extracto crudo de *Opuntia ficus-indica* con hexano y cloroformo como solventes respectivamente. Mostrando un rendimiento mayor en la parte insoluble en cloroformo o partición metanólica.

Tabla 11. Rendimiento de las particiones del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*

Partición	% Rendimiento
Insoluble en cloroformo	96.8
Soluble en hexano	2.69
Soluble en cloroformo	0.503

6.5 Identificación de compuestos presentes en las fracciones activas, por cromatografía de gases acoplado a masas.

Las fracciones clorofórmicas y hexánicas del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* se sometieron a un análisis por CG-MS para la identificación de compuestos, ya que fueron las fracciones que presentaron mayor bioactividad en contra de los parámetros de calidad espermática y morfología testicular

En la Figura 12 se muestra el espectro de la partición soluble en cloroformo en el que se observan diversas señales, identificando el pico más alto con tiempo de retención (TR) de 25.29 unidades, se propone que el compuesto corresponde al N-etil-1,3-ditioisoindolina, la cual se identificó con un 59 % de

certeza de acuerdo a la librería Wiley 7n.1 de la base de datos del equipo (HP19091J-433 Hewelwt Packard, Abonadle, PA).

En la figura 13 se muestra el espectro de la partición soluble en hexano en el que se observan diversas señales, identificando el pico más alto con TR de 25.30 unidades, se propone que el compuesto corresponde al Ciclobutano, 1,2:3,4-di-o-propaneboronato-1-octeno.

File : C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Dic\18\0200002.D
Operator :
Acquired : 18 Dec 2013 14:26 using AcqMethod 8270
Instrument : Instrumen
Sample Name: Mta-01
Misc Info : metanol sc
Vial Number: 2

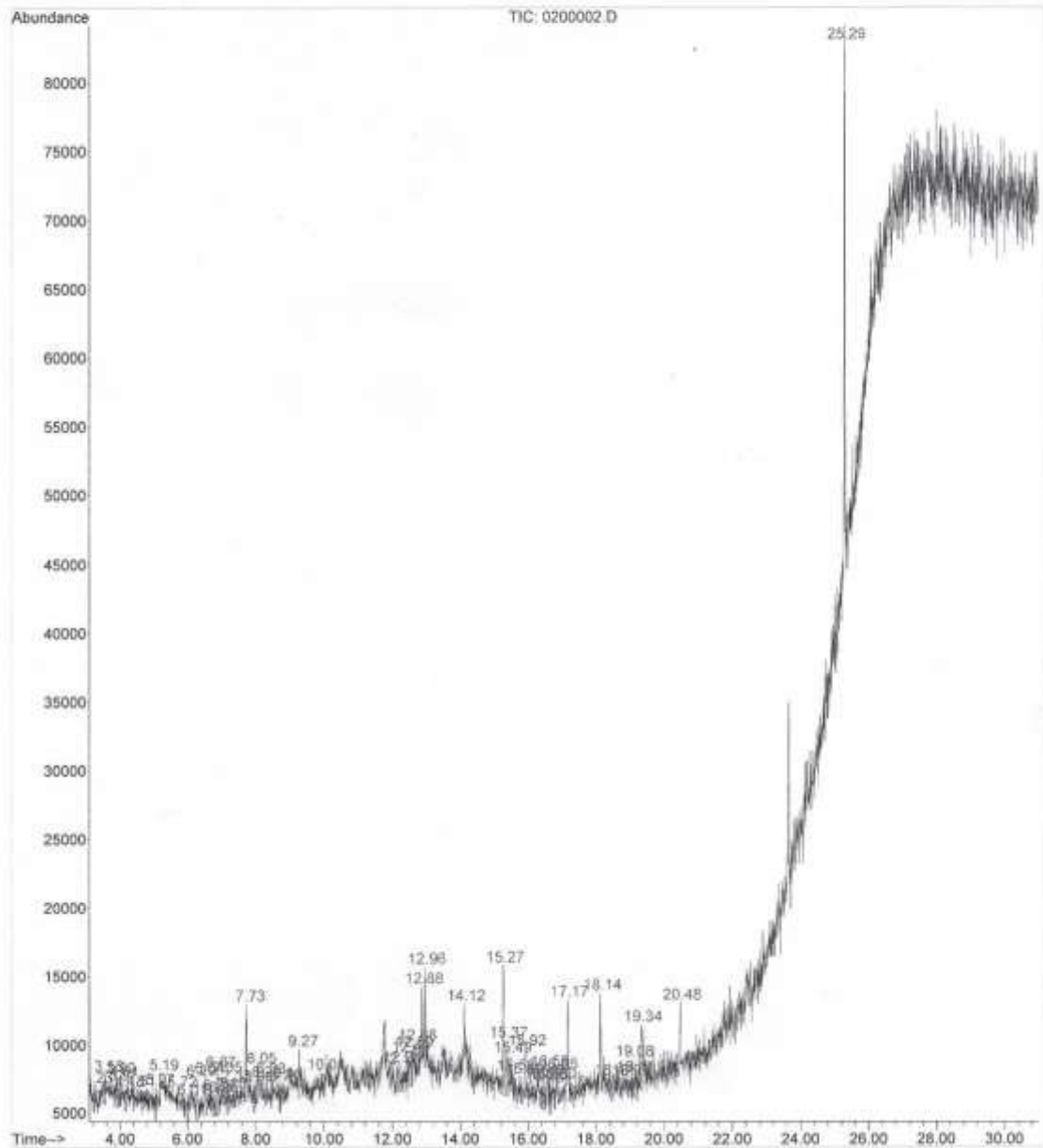


Figura 12. Cromatograma de la partición soluble en cloroformo del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*

File :C:\MSDCHEM\1\DATA\13\Dic\18\0300004.D
 Operator :
 Acquired : 18 Dec 2013 15:43 using AcqMethod 8270
 Instrument : Instrumen
 Sample Name: Mta-02
 Misc Info : hexano sh
 Vial Number: 3

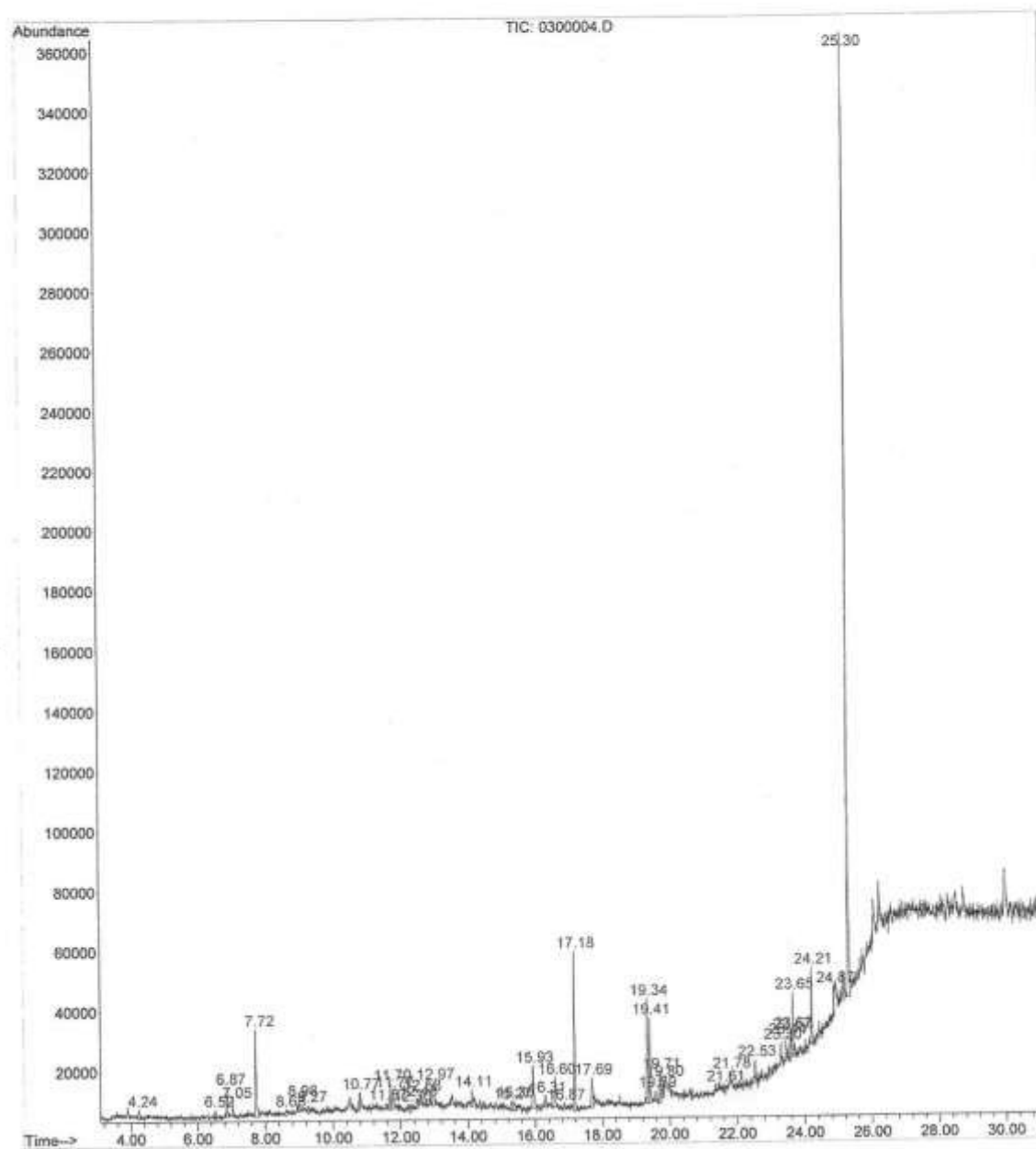


Figura 13. Cromatograma de la partición soluble en hexano del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*

7.- DISCUSIÓN

Desde hace décadas, el empleo de plantas medicinales y de los productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante. Esto se debe a una serie de factores, entre los cuales debemos destacar en muchos casos el conocimiento preciso de la composición química y el hecho de que en la actualidad dicha utilización se fundamenta en numerosos ensayos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*. De esta manera, el uso de las especies vegetales medicinales que se ha venido haciendo en forma empírica y basada en la tradición tiene hoy una base científica con nuevas herramientas analíticas (Araujo *et al.*, 2004). Las plantas evaluadas en este estudio se seleccionaron bajo tres de los cinco criterios propuestos por Williamson (1996), por sus características etnofarmacológicas, por su distribución en el semidesierto del Norte de México, y por antecedentes de actividad biológica. El eluyente empleado en el proceso de maceración de las plantas en estudio fue metanol, se seleccionó por su alta polaridad ya que se desconoce el tipo de molécula responsable y lo que se buscó fue obtener un extracto crudo con el mayor número posible de principios activos. Posteriormente al extracto que presentó mayor actividad biológica contra la reproducción fue sometido a un fraccionamiento y fue probada nuevamente su actividad contra la reproducción como lo proponen Rondina *et al.*, (1991).

Los porcentajes de rendimiento obtenidos de las partes aéreas de las plantas procesadas por maceración en metanol fueron muy variados entre cada uno de ellos, el extracto donde se obtuvo el menor rendimiento fue *Cynodon dactylon*, esto debido a que la polaridad de los grupos funcionales presentes en esta planta fue menor, el que le siguió fue el extracto de *Opuntia ficus-indica*, posteriormente *Tagetes lucida* y el extracto que presentó mayor rendimiento fue *Lippia graveolens* indicando una mayor presencia de grupos funcionales con alta polaridad debido a la afinidad de los grupos funcionales por el solvente empleado en el proceso.

El análisis fitoquímico preliminar de los extractos crudos mostró la presencia de diversos grupos funcionales, se ha reportado en *Cynodon dactylon* la presencia

de: β -sitosterol, flavonoides, alcaloides, glicosidos, triterpenos, vitamina C, carotenos, grasas, ácido palmítico (Chidawar *et al.*, 2011; Prakash, 2011), lo que demuestra que en base a los análisis realizados existe una relación estrecha de lo reportado por otros autores y este trabajo, ya que las pruebas realizadas dieron positivas para los esteroides como puede ser β -sitosterol, así mismo para alcaloides, flavonas, saponinas o grasas, en contraste se encontró que en este estudio dio negativo para la presencia de terpenos, lo cual puede ser atribuido al solvente que fue empleado para la obtención de los extractos; en otros estudios *Lippia graveolens* ha presentado reportes de la presencia de flavonoides, aglicanos, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos, derivados del fenilpropano estearopteno y dos tipos de fenoles, en mayor contenido el carvacrol y en menor proporción el timol. Las raíces contienen estaquiosa y los tallos sustancias tánicas (Longe, 2005; Arcila-Lozano *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2010), en este estudio se identificó la presencia de cumarinas, esteroides, antraquinonas, antocianinas y flavonas y dio negativo para la presencia de terpenos y taninos, en contraste con lo reportado, esto pudo ser debido a que los autores analizaron los aceites esenciales de la planta y en este estudio se realizó por medio de maceración por metanol obteniendo moléculas de distinta polaridad en cada metodología.

Por su parte *Opuntia ficus-indica* tiene reportes de la presencia de una gran variedad de compuestos como ácido hialurónico, polisacáridos como pectina, prolina, azúcares como galactosa, arabinosa, xilosa, ramosa, glucosa, así como vitamina C, A, B1, B6, lípidos, proteínas, aminoácidos como prolina, glutamina, taurina, también carotenoides, tocoferol, polifenol, flavonoides, entre otros iones (Atef *et al.*, 2013; Kauretal *et al.*, 2012; Ennouri *et al.*, 2006), en este estudio no se identificó la presencia de terpenos como lo es la vitamina A, ya que los reportes indican de su presencia en el fruto de la planta (Kaur *et al.*, 2012) y el análisis fitoquímico que llevamos a cabo se realizó de los cladios de *O. ficus-indica*, se indentifico la presencia de cumarinas, esteroides, saponinas, antocianinas, taninos pirogálicos, flavonas

En las pruebas fitoquímicas realizadas al extracto metanólico de *T. lucida* se

identificaron saponinas, flavonoides, esteroides, alcaloides y antocianinas, identificando algunas diferencias con los resultados encontrados en la literatura ya que reportan que *T. lucida* es una especie medicinal cuyo principal compuesto activo acumulado en las partes aéreas, es un aceite esencial constituido fundamentalmente por metilchavicol, se refiere que posee además 7 cumarinas las cuales en nuestro estudio dieron negativo para la presencia de las mismas, también se reporta la presencia de 3 flavonoides, dando positivo solo en la presencia de flavonas (Acosta *et al.*, 2011), así mismo se ha reportado la presencia de terpenoides en las hojas contrastando con lo reportado en esta investigación, ya que para la presencia de terpenos dio negativo (Capunzo, 2003).

Con respecto al ensayo de letalidad sobre *A. salina* es una técnica que ha sido ampliamente utilizada para seleccionar extractos crudos con potencial biológico, debido a que se ha demostrado que el crustáceo es sensible a un amplio rango de compuestos con actividad biológica (Meyer *et al.*, 1982; Bastos *et al.*, 2009; Almeida-Alves *et al.*, 2000; Massele and Nshimo, 1995; Solis *et al.*, 1993; Nieto *et al.*, 2008; Vanhaeckele *et al.*, 1998). Se ha determinado que esta técnica tiene una posible correlación con la pruebas específicas de toxicidad (McLaughlin, 1998)

Para evaluar la toxicidad de los extractos metanólicos de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens*, *Opuntia ficus-indica* y *Tagetes lucida* se utilizó el ensayo de letalidad sobre *A. salina* y se obtuvieron en los casos de *Cynodon dactylon* y *Opuntia ficus-indica* valores de DL₅₀ superiores a 1,000 µg/mL, lo cual indica que el extracto no es tóxico según los criterio de Lagarto-Parra *et al.*, (2001) y según la escala de Déciga-Campos (2010). Para el extracto de *Lippia graveolens* se obtuvo una DL₅₀ de 247.87 µg/mL y *Tagetes lucida* una DL₅₀ de 454.02 µg/mL, según los criterios de Lagarto-Parra *et al.*, (2001) son extractos activos. Considerando estos criterios se puede establecer un futuro prometedor de *Opuntia ficus-indica* ya que fue el extracto que demostró mayor actividad biológica contra la calidad espermática y menor toxicidad contra los nauplios de

A. salina y ha sido empleado como alimento desde tiempos ancestrales hasta la actualidad sin presentar reportes de toxicidad.

Se midió el comportamiento del peso corporal de las ratas tratadas y controles durante la investigación en intervalos de tiempo de 1 semana cada medición, observándose que en el grupo de *Opuntia ficus-indica* hubo una disminución significativa en dicho parámetro con respecto al grupo control negativo y los grupos tratamiento, Grube *et al.* (2013), reportan el efecto sobre la disminución de peso corporal en pacientes administrados con una fibra aislada de *Opuntia ficus-indica* sin reportar efectos secundarios en los pacientes, de la misma forma pero en un experimento en ratas Ennouri *et al.* (2006), observaron la disminución de colesterol, proteínas de baja densidad y disminución de peso corporal, sin reportar alteraciones en el estado de salud de los animales de experimentación, ambas investigaciones mantienen una relación estrecha con este grupo ya que aparentemente no se ve comprometida la salud de las unidades experimentales con la administración de *Opuntia ficus-indica*. Con respecto a los pesos corporales de los tratamientos de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens* y *Tagetes lucida* no mostraron alteración significativa durante la alimentación en el tratamiento, resultados similares pero con extracto de semilla de *Abrus precatorius* indican que el extracto no promueve el aumento de peso que causa la obesidad o retención de agua (Bath *et al.*, 2007).

Otro de los parámetros evaluados en esta investigación fue el peso y longitud de los testículos y epidídimos de los animales expuestos, así como los niveles plasmáticos de testosterona, observándose en el grupo de *Lippia graveolens* una disminución del peso y la longitud del testículo así como niveles bajos de testosterona en suero, Gopalkrishnan (2011) en un estudio similar pero con el extracto de semilla de *Madhuca latifolia*, reportó la disminución del tamaño de los testículos en ratas, en concordancia con la disminución en los niveles plasmáticos de testosterona, indicando que dicha disminución en el tamaño de los testículos es ocasionada por la atrofia en tejido glandular y la reducción en las células secretorias por la disminución en los niveles de testosterona, ya que esta hormona es la que estimula en gran medida el desarrollo de los órganos

sexuales masculinos. En el caso del grupo administrado con *Tagetes lucida* se observa un incremento del tamaño y peso de testículo en concordancia con niveles altos de testosterona en plasma, Gui-Yan (1998) empleo testosterona como tratamiento ha personas con hipogonadismo mostrando el incremento de los testículos en los pacientes, así mismo Singh *et al.* (1995), observaron que con la administración de testosterona en ratones con hipogonadismo lograba incrementar el número de células espermáticas y los niveles de testosterona. Meena (2012) administró a ratas macho una combinación de dienogestrel y testosterona lo que ocasionó una disminución en los niveles de testosterona plasmática y la disminución del peso de los testículos ocasionando una inhibición en la espermatogénesis. En el caso del tratamiento con *Opuntia ficus-indica* no se observa una relación estrecha entre los parámetros de los niveles plasmáticos de testosterona con los pesos y longitudes de los testículos, ya que en estudios similares están relacionados directamente proporcional la disminución del tamaño del testículo con niveles bajos de testosterona y aquí se observa una disminución significativa en los niveles de testosterona pero no existe diferencia significativa ni del peso ni de la longitud de los testículos con respecto al control negativo, posiblemente ocasionado por una inflamación en este tejido.

Como parámetros de calidad espermática se determinaron la motilidad, densidad, viabilidad y ensayo cometa, observándose en el grupo de *Opuntia ficus-indica* una disminución marcada en estos parámetros, por debajo de los grupos evaluados y los controles. Este grupo presentó una concentración espermática de 10.8 millones de espermatozoides por mL y el grupo control negativo 28.20 millones de espermatozoides por mL, solo el 31.8 % de estas células se encontraban vivas, en cuanto al control negativo el 75 % de las células presentaron vida, la motilidad o movimiento progresivo que presentó el grupo de *Opuntia* fue de 28.6 % y el control negativo presento un movimiento progresivo de 78.20 %, al evaluar por medio del ensayo cometa las células individuales del grupo de *Opuntia*, observamos que el mayor número de células cuantificadas se encontraba en el nivel de daño IV o células totalmente

dañadas con cometas visibles. En otra investigación con ratas donde se administró extracto etanólico de *Lagenaria breviflora*, los espermatozoides presentaron anomalías en la morfología pero la viabilidad de las células estaban dentro del rango de las ratas control, lo que demuestra que el extracto no afectó la viabilidad de espermatozoides pero causó la deformación de las células afectando su movilidad; caso contrario a este estudio donde los parámetros de la concentración espermática, motilidad y viabilidad fueron afectados significativamente en comparación con el grupo control. Otro reporte pero con extracto etanólico al 50 % de la raíz de *Martynia annua* dio como resultado un nulo conteo de los espermatozoides testiculares y epididimales causando lesiones en los túbulos seminíferos relacionados con la dosis administrada. En otra investigación realizada en ratas *Sprague Dawley* donde se comparó la respuesta de ciclofosfamida (CF) y bleomicina (BL) se observó un efecto mutagénico de ambos compuestos, obteniéndose cabezas de espermatozoides anómalas con la CF en comparación con la BL, a la misma dosis, diseño y vía utilizada, observándose a la vez una disminución en la concentración espermática, (Arencibia y Rosario, 2011) lo cual refleja resultados similares a esta investigación. Ratas macho administradas con nanopartículas de plata de diferente tamaño y bajo diferentes tiempos de exposición reveló que estas causaron disminución en el conteo de espermatozoides, en paralelo aumentó los niveles de daños en células espermáticas evaluadas por electroforesis en gel de células individuales, la morfología espermática se vio comprometida (Gromadzka-Ostrowska *et al.*, 2011) observándose gran similitud en los resultados encontrados en nuestra investigación, a razón que de una menor viabilidad y motilidad se aumenta el nivel de daño en las dobles cadenas de ADN espermático.

Los cortes histológicos de testículo realizados a las ratas tratadas y control positivo muestran daños en el tejido, sin embargo en el grupo tratado con *Opuntia* se observa este daño más generalizado, el haz de luz de los túbulos seminíferos de este grupo presenta una concentración menor de espermatozoides, si se equipara con la cuantificación de espermatozoides se ve

una relación estrecha entre ambos, así mismo se observa una disminución en las células de sostén lo cual se relaciona con la madurez de los espermatozoides afectando la concentración espermática, movilidad y viabilidad de los mismos.

Meena *et al.*, (2012), realizaron un estudio en el cual administraron testosterona con diengestrol a ratas macho, en las cuales se observó una disminución marcada en la espermatogénesis de los animales tratados, en los cortes histológicos de testículo se observó una disminución de las células germinativas y de los espermatozoides, lo cual se ve reflejado en el peso de los testículos.

Gopalkrishnan y N.Shimpi (2011), reportaron que el extracto de semilla de *Madhuca latifolia* causaba efectos muy similares a los encontrados en nuestra investigación, ya que los cortes histológicos de testículo de rata albina mostraron espacios vacíos denominados vacuolas, afectando estos espacios a la producción de espermatozoides y la disminución de células germinativas las cuales dan la madurez necesaria a los espermatozoides, reflejándose en la movilidad, motilidad y niveles séricos de testosterona.

Mali *et al.*, (2002), reportaron que la administración del extracto de la raíz de *Martynia annua* en ratas macho, afecta progresivamente la morfología testicular conforme las dosis de este extracto se incrementa, dando como consecuencia de este daño morfológico, disminución en la concentración espermática, movilidad atípica de los espermatozoides y viabilidad espermática baja, resultados similares se presentan en esta investigación donde la morfología testicular esta de la mano con la baja calidad espermática y los niveles séricos de testosterona.

La información obtenida con esta investigación científica aporta que los extractos evaluados presentan actividad contra la espermatogénesis, en diferentes grados de afectación, observándose una mayor actividad en el extracto de *Opuntia ficus-indica*. Por tal motivo se realizaron particiones hexánicas, clorofórmicas e insoluble en cloroformo a este extracto, para

determinar cuál o cuáles de las particiones son las responsables de la actividad contra la espermatogénesis.

Se encontró que la partición clorofórmica disminuyó significativamente la concentración espermática, la motilidad y la viabilidad espermática, así mismo los niveles de testosterona en suero presentan una disminución significativa con respecto a los controles. El nivel de daño observado en las cadenas de ADN de las células espermáticas del grupo tratado con la partición clorofórmica, presenta altas rupturas, lo que se traduce como niveles altos de migración de ADN. Los cortes histológicos de testículos en los grupos tratados con la partición clorofórmica, también muestran anomalías morfológicas como vacuolización, ausencia de células germinativas y baja densidad espermática en el haz de luz de los túbulos seminíferos.

El análisis seminal permite dar información sobre la espermatogénesis y la condición fisiológica de los tejidos comprometidos (Aitken, 2010), observándose en esta investigación que las anomalías en la calidad espermática son un reflejo de la influencia de la concentración sérica de testosterona y por ende se observa alteraciones en la estructura testicular ya que la testosterona está estrechamente relacionada con la producción de las hormonas Folículo estimulante y la hormona Luteinizante que a su vez, estas actúan sobre las células de Sertoli y las células intersticiales las cuales son las encargadas del desarrollo y maduración de los espermatozoides. En la década de los 50, MacLeod & Gold (1953) comenzaron a comparar los seminogramas de personas fértiles con pacientes con problemas para concebir un hijo, encontrando una estrecha relación entre la concentración espermática, la motilidad de ellos y su influencia en la capacidad fecundante de los varones en estudio. En los últimos años el análisis seminal continúa siendo una de las mejores herramientas en la investigación de la fertilidad masculina y la que brinda la mejor información previa para evaluar la calidad reproductiva de los varones (Espinoza-Navarro y Sarabia, 2011).

Los resultados obtenidos de los espectros por CG-MS en la partición soluble en hexano del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*, muestran 41 señales con tiempos de retención que va desde 4.24 grados hasta 25.30, dentro de los compuestos identificados en esta partición, se encuentra el ácido palmítico, con un tiempo de retención de 17.18 y una confiabilidad de 97%, también se identificó el ácido oleico con un tiempo de retención de 17.69 y una confiabilidad del 53%, ambos compuestos fueron reportados por James Duke con efecto antiandrogénico, por lo tanto estos compuestos pueden ser los responsables de que los niveles de testosterona fueran disminuidos, provocando con ello la disminución de los parámetros de calidad espermática y la fisiología del testículo.

La partición soluble en cloroformo muestra 60 señales con tiempos de retención que van desde 3.23 hasta 25.29, de los compuestos identificados se encuentran el ácido linoleico con un tiempo de retención de 19.35 y una confiabilidad de 35, el ácido oleico y el ácido palmítico con un tiempo de retención de 15.92 y una confiabilidad del 37 %, estos compuestos según la Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical database, tienen efectos antiandrogénicos, los cuales pudieron afectar las concentraciones de Testosterona, que a su vez disminuyó la calidad espermática y comprometió el tejido testicular.

8.- CONCLUSIONES

- Los extractos metanólicos de *Cynodon dactylon*, *Lippia graveolens* H.B.K., *Tagetes lucida* y *Opuntia ficus-indica* del que se obtuvo mayor rendimiento fue de la parte aérea de *Lippi graveolens* con un 18.76% y el menor del extracto de *Cynodon dactylon* con un 2.29%.
- Los extractos de *Opuntia ficus-indica* y *Cynodon dactylon* no mostraron toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*.
- El peso corporal de los animales tratados con el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* se vio disminuido y el grupo que presentó mayor peso fue con el extracto de *Tagetes lucida* con respecto a los demás grupos tratados y los controles,
- Los niveles séricos de testosterona del grupo tratado con el extracto de *Opuntia ficus-indica* presentaron una disminución significativa respecto al grupo control negativo, el que presentó los niveles más altos de testosterona fue el grupo tratado con *Tagetes lucida*.
- La concentración, viabilidad y motilidad de los espermatozoides de ratas tratadas con el extracto de *Opuntia ficus-indica* disminuyó significativamente con respecto al grupo control negativo.
- El daño de los espermatozoides evaluado por medio del ensayo cometa en el grupo de *Opuntia ficus-india*, presentó niveles altos de rupturas de doble cadena del ADN.
- Los cortes histológicos efectuados a los testículos de las ratas administradas con el extracto de *Opuntia ficus-indica*, muestran un daño morfológico mayor que los observados que en los grupos administrados con los demás extractos y los controles.
- Los extractos metanólicos de las plantas en estudio: *C. dactylon*, *L. graveolens* H.B.K., *T. lucida* y *O. ficus-indica* presentaron actividad contra la espermatogénesis en ratas macho *Wistar* a una dosis de 50 mg/kg, siendo el extracto con mayor actividad el de *O. ficus-indica* al alterar significativamente cada uno de los parámetros evaluados con respecto al control negativo.

- La partición del extracto metanólico de *O. ficus-indica* con cloroformo y hexano, se llevó a cabo en este extracto por presentar la mayor bioactividad de las cuatro plantas evaluadas sobre la espermatogénesis. La soluble en cloroformo fue la que presentó mayor actividad sobre la espermatogénesis similar a los estudios efectuados sobre el extracto metanólico crudo.
- El análisis por CG-MS de las particiones soluble en hexano y soluble en cloroformo muestran la presencia de compuestos reportados con efecto antiadrogénico como el ácido linoleico, ácido palmítico y ácido oleico.

La administración oral del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* a ratas macho Wistar produjeron efectos en la calidad espermática y estructura testicular, específicamente en los túbulos seminíferos. Probablemente los compuestos presentes en el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* tengan influencia inhibitoria sobre la liberación de las hormonas gonadotrópicas las cuales a su vez son las responsables de la producción de testosterona por lo que al verse afectadas dichas hormonas, se produce una disminución de la producción de testosterona, lo que conduce a cambios en la espermatogénesis contrastada con la afectación de la concentración espermática, viabilidad y motilidad, así mismo el daño en la estructura testicular, aunado a su efecto genotóxico. Se proponen estudios complementarios para evaluar completamente la fertilidad y reversibilidad con la partición clorofórmica del extracto metanólico de esta planta por ser la responsable de dicha actividad.

9.- REFERENCIAS

- Aitken RJ. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J. Androl.* 2010; 12(1):99-103.
- Ali Thair, H.M. "Estudios sobre lavanda multifida L." Tesis doctoral. Inéd. Facultad de Farmacia, Universidad de granada. 1991.
- Almeida-Alves TM, Fonseca-Silva A, Brandão M, Mesquita-GrandiTS, Smânia EF, Júnior AS, Zani CL. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2000; 95:367-373.
- Álvarez-Gómez A. M., Cardona-Maya W. D., Castro-Alvarez J. F. Jimenez S., Cadavid A. Nuevas opciones en anticoncepción: posible uso espermicida de plantas colombianas. *ACTAS UROLÓGICAS ESPAÑOLAS.* 2007; 31(4):372-381.
- Álvarez-Gómez AM, Cardona-Maya WD, Castro-Álvarez JF, Jiménez S, Cadavid A. Nuevas opciones en anticoncepción: posible uso espermicida de plantas colombianas. *Actas Urol Esp.* 2007; 31(4):372-81.
- Amory JK, Page ST, Bremner WJ. Drug Insight: recent advances in male hormonal contraception. *Nat Clin Pract Endocrinol Metabol.* 2006; 2(1):32-41.
- Amory JK. Progress and prospects in male hormonal contraception. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 2008; 15(3):255–60.
- Anderson JE, Goetz CM, McLaughlin JL, Suffness M. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochem Analysis.* 1991; 2:107-11
- Araujo J, Córdova B, Rodríguez M, Salas R. Cuantificación de la actividad antimicrobiana de *Caesalpinia spinosa* contra *Staphylococcus aureus*. Resúmenes del III Congreso Peruano de Plantas Medicinales y Fitoterapia. 2004
- Arencibia AD, Rosario FL. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *REDVET.* 2011; 12(2):1-11.

- Arcila-Lozano, C.C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., González, M.E. El orégano: Propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de nutrición. 2004; 54(1): 100-111.
- Bajaj VK, Gupta RS. Fertility suppression in male albino rats by administration of methanolic extract of *Opuntia dillenii*. J of andrology. 2011; 44(1):1-8.
- Banta, J. P., D. L. Lalman, C. R. Krehbiel, and R. P. Wettemann. Whole soybean supplementation and cow age class: Effects on intake, digestion, performance, and reproduction of beef cows. J. Anim. Sci. 2008; 86:1-11.
- Barquero A.A. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. Revista Química Viva. 2007; 2: 19-35.
- Bastos MLA, Lima MRF, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EMM, Lemos RPL. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2009; 8(16): 1-6
- Bhatt N, Chaela SL, Rao MV. Contraceptive evaluation of seed extract of *Abrus precatorius* (L.) in male mice (MUS MUSCULUS). J.Herb.Med. Toxicol. 2007; 1(1): 47-50
- Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definición y causa de la infertilidad. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2003; 54(4):227-48.
- Butterweck V, Semlin L, Feistel B, Pischel I, Bauer K, Verspohl EJ. Comparative evaluation of two different *Opuntia ficus-indica* extracts for blood sugar lowering effects in rats. Phytother Res. 2010
- Capunzo M, Bunetti L, Cavallo P, Boccia G, De Caro F, Leluzzi. Antimicrobial activity of dry extracts of *Tagetes lucida* from Guatemala. JPMH. 2003; 44:85-87.
- Chidrawar VR, Chitme HR, Patel KN, Patel NJ, Racharla VR, Dhoraji NC, Vadalía KR. Effects of *Cynodon dactylon* on Stress-Induced Infertility in Male Rats. J. Young Pharm. 2011; 3(1): 26-35.
- Clayson, D.B. y Grant, D.L. The assessment of mutagenicity. Health protection branch mutagenicity guidelines. Environmental and Molecular Mutagenesis: 1992; 21:15-37.

- Collins AR. The Comet Assay for ADN Damage and Repair: principles, applications, and limitations . Mol Biotechnol. 2004; 26(3):249-61.
- Cortinas, N.C. y Aguirre, E.J. Cáncer y ambiente, bases epidemiológicas para su investigación y control. Modulo Carcinogénesis. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Programa de Salud Ambiental, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de La Salud. México. 1990; 33-43.
- Dahanukar S.A., Kulkarni R.A. and Rege N.N. Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products. Indian Journal of Pharmacology. 2000; 32:81-118.
- De la Cruz RWF, Luján MKM, Miranda SUE. Efectos del malathion sobre la espermatogénesis de ratones machos jóvenes de la cepa BALBC53. Ciudad de Ica, Facultad de Medicina Humana. Universidad Nacional San Luis Gonzaga, 2004.
- Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral G., Angeles-López G.E., Naverrete A., Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in tradicional medicine. J. Ethnopharmacol 2007; 110: 334-342.
- Ennouri M, Fetoui H, Bourret E, Zeghal N, Attia H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. 2006; 97(12):1382-6
- EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. fifth edition. United States Environmental Protection Agency. Washington, DC. 275. Evaluation of medicinal plant antimicrobial activity." Letters in Applied Microbiology. 2002; 30: 379-384.
- Espermiograma: Nuevos Límites Inferiores de Referencia. Int. J. Morphol. 2011; 29(3):885-90.
- Espinosa, F. J. y J. Sarukhán, Manual de Malezas del Valle de México. Claves, descripciones e ilustraciones. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica. México, D. F. 1997

- Espinoza-Navarro O, Sarabia L. Evaluación y Estandarización de la Calidad del Espermograma: Nuevos Límites Inferiores de Referencia. *Int. J. Morphol.* 2011; 29(3):885-890.
- Eun Ha Lee, Hyung Ja Kim, Yun Seon Song, Changbae Jin, Kyung-Tae Lee, Jungsook Cho, and Yong Sup Lee. Constituents of the Stems and Fruits of *Opuntia ficus-indica* var. *Saboten*. Division of Life Sciences. 2003; 780-714.
- Faleiro, Leonor. "Antibacterial and Antioxidant Activities of Essential Oils Isolated from *Thymbra capitata* L. (Cav.) and *Origanum vulgare* L.". *J. Agric. Food Chem.* 2005; 53
- Farnsworth, N. R. Biodiversity Wilson. Ed. National Academy Press. Washington D.C. pp. 1997; 83-97.
- Fernández-López JA, Almela L, Obón JM, Castellar R. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010; 65(3):253-9.
- Fernández-López JA, Almela L, Obón JM, Castellar R. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010; 65(3):253-9.
- Force, M., Sparks, W.S., Ronzio, R.A. Inhibition of enteric parasites by emulsified oil of oregano in vivo. *Phytotherapy Research.* 2000; 14(3): 213–214.
- Galisteo Moya, M.M. *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath & Maire: Estudio farmacognóstico". Tesis doctoral inéd. Facultad de farmacia, Universidad de Granada. 1997.
- Gonzalez Elizondo M, López Enriquez I.,Gonzalez Elizondo M. Tena Flores J. Plantas Medicinales del Estado de Durango y Zonas Aledañas, CIIDIR Durango. Instituto Politécnico Nacional. Mexico, D.F. 2004; 41
- González Sampedro R., Rivero Jiménez R, Suárez Batista L, González González J, Díaz Concepción A, González García Y Rubio Rubio R. Descripción de un inmunoensayo enzimático que reconoce anticuerpos Anti-Factor VIII/VON Willebrand obtenidos a partir de hibridomas Múridos. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 1999; 15(1):46-53.
- González-Chávez L. Investigación participativa en etnobotánica. Algunos procedimientos coadyuvantes en ella. Magazine, [Online]. Disponible en :

- <http://www.dimensionantropologica.inah.gob.mx/index.php?sIdArt=346&cVol=8>
&n. 2008.
- Gopalkrishnan B, Shimpi SN. Antifertility effect of *Madhuca latifolia* (ROXB.) macbride seed extract. *IJABPT*. 2011; 2(4):50-3.
- Guarrera, P.M., Lucchese, F., Medori, S. Ethnophytherapeutical research high Molise region central-southern Italy. *J. Ethnobiol Ethnomed*. 2008; 4(7): 1-11.
- Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, Gajowik A, Radzikowska J, Wojewódzka M, Kruszewski M. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol Lett*. 2012; 15;214(3):251-258.
- Grube B, Chong PW, Lau KZ, Orzechowski HD. A natural fiber complex reduces body weight in the overweight and obese: a double-blind, randomized, placebocontrolled study. 2013; 21(1):58-64.
- Harvey A. Medicines from nature: are natural products still relevant to drug discovery? *Trends Pharmacology Science* 1999; 20: 196-198.
- Hostettmann K., Wolfender J. "Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts" *Plant Med*. 1997; 63: 2-10.
- Huang KC. *The pharmacology of Chinese herbs*. Second edition. CRC. USA. 1999.; pp 327-328.
- Kamboj V. P. Herbal medicine. *Current Science*. 2000; 78; 35-39.
- Kawai Y, Hata T, Suzuki O, Matsuda J. The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. *J. Reprod Dev*. 2006; 52(4):561-568.
- Khillare B., Shrivastav T.G. Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. Elsevier Inc. 2003; 68: 225–229.
- Kuklinski C. *Farmacognosia*. España, ed. Omega. 2000; pp. 51-52.
- Lagarto-Parra A, Silva-Yhebra R, Guerra Sardiñas I, Iglesias Buela L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50) in mice in order to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001; 8(5): 395-400.
- Lehninger, A., Nelson, D. Cox, M. *Principles of Biochemistry*, 2nd edition. Worth Publishers. N.Y., USA. 1993.

- Longe, J.L. The Gale Encyclopedia of Alternative Medicine. Farmington Hills, MI: Thompson-Gale. 2005.
- Lopez L.M., Grimes D.A., Schultz K.F. Nonhormonal Drugs for Contraception in Men: A Systematic Review. *Obstetrical and Gynecological Survey*. 2005; Vol. 60 Number 11
- Lytovchenko, A., Beleggia R., Schauer, N., Isaacson, T., Leuendodorf J. E., Hellman, H., Roce J KC., y Fernie AR. Application of GC-MS for the detection of lipophilic compounds in diverse plant tissues. *Plant Methods*. 2009; 5(4) 1-11.
- MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. VI. Semen quality and certain other factors in relation to ease of conception. *Fertil. Steril*. 1953; (1):10-33.
- Mali PC, Ansari AS, Chaturvedi M. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. *J of Ethnopharmacology*. 2002; 82:61-7.
- Universidad Nacional Autónoma de México. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?1=&t=anticonceptivo&id=1611>. Acceso 21 de marzo de 2013.
- Márquez, A. C.; F. Lara O.; B. Esquivel R. y R. Mata E. Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1999.
- Martínez, M., Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. *Arch Pharm Res* 1979; Vol 26, No 12, 1018-1023.
- Massele AY and Nshimo CM. Brine shrimp bioassay for biological activity of medicinal plants used in traditional medicines in Tanzania. *East African Medical Journal*. 1995; 72:661-663.
- Meena R, Mohan MM, Ghosh D, Nandan D. Complete sperm suppression induced by dienogest plus testosterone undecanoate is associated with down- regulation in the expression of upstream steroidogenic enzyme genes in rat testis. *Contraception*. 2012; 86(2):1-20.

- McLaughlin JL, Chang Ch, Smith DL. Simple bioassay for the detection and isolation of bioactive natural products. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA. 1988.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putman JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Med.* 1982; 45:31-4
- Miró Jodral, M. Screening fitoquímico en plantas superiores. Detección de su actividad antiinflamatoria y antimicrobiana. Tesis doctoral. Inéd. Facultad de farmacia. Universidad de Granada. 1981.
- Molina-Salinas G, Fernández-Said S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). *Pharmacology on line.* 2006; 3:633-38.
- Murray R. K., Bender D. A., Bothan K. M., Kennelly P. J., Rodwell V. W. and Weil P A. *Harper Bioquímica Ilustrada.* 2010; 28^a ed. McGraw Hill. México. pp. 429-430.
- Navarro GV, Rojas G, Zepeda GL, Avilés M, Fuentes M, Herrera AJE. Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology (Formerly International Journal of Pharmacognosy).* 2006; 44(4):297-300.
- Nieto I, Salama A, Cataño J, Chegwin C. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2008; 25:186-187.
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. SAGARPA.
- Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology.* 2000; 30:379-84.
- NovaTein Biosciences. Rat Testosterone ELISA Kit. Catálogo NB-E30597
- Prakash NB, Solanki R. *Cynodon dactylon*(L)Pers.:a valuable medicinal plant. *Research J of Medicinal Plant.* 2011; 5(5: 508-514.

- Rondina R., Palacios P., Filip R., D.Coussio J. Fraccionamiento de Extractos Vegetales por Extracción Líquido/Sólido Utilizando un Soporte Diatomáceo Inerte. *Acta Farm Bonaerense*. 1991; 10 (1): 49-5.
- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski, Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. 2001.
- Shakti N. Upadhyay, Suman Dhawan and G. P. Talwar. Antifertility Effects of Neem (*Azadirachta indica*) Oil in Male Rats by Single Intra-Vas Administration: An Alternate Approach to Vasectomy. *Journal of Andrology*. 1993; 14; 275-281.
- Shakti N. Upadhyay, Suman Dhawan and G. P. Talwar. Antifertility Effects of Neem (*Azadirachta indica*) Oil in Male Rats by Single Intra-Vas Administration: An Alternate Approach to Vasectomy. *Journal of Andrology*. 1993; 14; 275-281.
- Sharp PE, La Regina MC. The laboratory rat. CRS press LLC. 1998
- Singh A., Singh S.K. Reversible antifertility effect of aqueous leaf extract of *Allamanda cathartica* L. in male laboratory mice. *Journal of Andrology*. 2008; 40, 337–345.
- Singh, N.P., McCoy M.T., Tice R.R. y Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*. 1988; 175: 184-191.
- Sobarzo C, Bustos-Obregon E. Acute effect of Parathion on the seminiferous epithelium of immature mice. *Rev. Chil. Anat.* 2000; 18(1):61-8.
- Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med.* 1993; 59:250–252.
- Stuart Ira Fox. *Fisiología Humana*. Mc Graw Hill. 2003; pp.664-665
- Sukh Dev. Ancient-Modern Concordance in Ayurvedic Plants: Some Examples. *Environmental Health Perspectives*. 1999; 107: 783-789.
- Talwar, G.P., Raghuvanshi, P., Misra, R., Mukherjee, S., Poonam, R., Shah, S. Plant immunomodulators for termination of unwanted pregnancy and for contraception and reproductive health. *Immunology and Cell Biology*. 1997; 75: 190-192.
- Tripathi, K.D. *Essentials of Medical Pharmacology*, 5a. ed. Jaypee, Brothers Medical Publishers, India. 2003.

- Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol Env Safety*. 1998; 5:382–387.
- Vega-Menchaca MC, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Morales-Rubio ME, Núñez-González A, Rivera-Guillen MA, Serrano-Gallardo LB, Rivas-Morales C. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum fruscenscens* (Berl) I.M. Johnston del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. *Rev Mex Cienc Farm*. 2013; 44(2):24-30
- Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, Verma RK, Yadav AK, Singh HP. *Chem Biodivers*. Chemical diversity in Indian oregano (*Origanum vulgare* L.). 2010; 7(8):2054-64
- Villaseñor R., J. L. y F. J. Espinosa G. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 1998.
- Voet, D., Voet, J.G., and Pratt, C.W. *Fundamentals of Biochemistry*. 2nd. Ed. John Wiley and Sons 2006.
- Williamson EM, Okpako DT. *Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material*. England, Wiley and Sons. 1996
- Zanoli, P., Benelli, A., Zavatti, M., Rivasi M, Baraldi, C., Baraldi, M. Improved sexual behavior in male rats treated with a Chinese herbal extract: hormonal and neuronal implications. *Asian J Androl*. 2009; 10(6):937-945.