

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



LIBRERIA CENTRAL

EXTRACTOS ORGANICOS OBTENIDOS DE *Amara fraxinifera* L.
POSIBLE ACTIVIDAD ANTIFERTILIZANTE SOBRE LOS
ESPERMATOZOIDES Y ACOSIADOS DE MURCIANO

TESIS DE GRADUACION
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T A
D O N D O N A
GARCIA PLAZUELOS

1963/07/15

Universidad de Guadaluajara

FACULTAD DE CIENCIAS

CUORA



BIBLIOTECA CENTRAL

EXTRACTOS ORGANICOS OBTENIDOS DE Puntas fadoras Y SU
POSIBLE ACTIVIDAD AMFERTILIZANTE SOBRE LOS
ESPERMATOZOIDES EYACULADOS DE HUMANO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN FISIOLGIA
Y QUIMICA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTA

028650/69141
B.70
5.2

EXTRACTOS ORGANICOS OBTENIDOS DE Bursera fagaroides Y SU
POSIBLE ACTIVIDAD ANTIFERTILIZANTE SOBRE LOS
ESPERMATOZOIDES EYACULADOS DE HUMANO.

RITA GARCIA PLASCENCIA.

DIRECTOR: M. en C. JUAN MORA GALINDO.

ASESOR: M. en C. LUIS HUACUJA RUIZ.

De manera muy especial con todo cariño y admiración le doy gracias a mi padre, que en vida fue ejemplo de rectitud y honestidad a su vez por sus sabios consejos. A mi madre por darme su apoyo y cariño alentandome a lograr mis anhelos.

A mis hermanos que con su apoyo y cariño, supieron impulsarme - a realizar mis estudios profesionales, dedicandome un poco de su tiempo, sin interés alguno.

A mis amigos que me brindaron su apoyo impulsandome a cumplir con la meta deseada.

Agradezco al M. en C. Luis Huacuja Ruiz
su apoyo y su acertada dirección en la
elaboración de esta tesis.

Agradezco al M. en C. Juan Mora Galindo
por su apoyo y asesoría.

A MIS MAESTROS.

Que con dedicación y responsabilidad
me guiaron por el camino de la ense-
ñanza para ser hoy una mujer de pro-
vecho.

A todas y cada una de las personas
que contribuyeron para llegar a ser
una profesionista.

A la Universidad de Guadalajara
Facultad de Ciencias.

I N T R O D U C C I O N .

Es del conocimiento general que la terapia por medio de las plantas medicinales tiene orígenes muy remotos. Los primeros vestigios de su empleo como medicamentos, se encuentran en efecto entre los pueblos asiáticos 8 000 A.C. y más tarde entre los egipcios, hebreos y fenicios 3 000 a 2 000 A.C. (1). El primer estudio cuidadoso de las plantas fue realizado por quienes practicaban la medicina herbolaria, pruebas de ellos lo constituye el Papiro de Ebers 1 500 A.C. el cual contiene una lista de plantas medicinales y se precisa el uso de ellas (2).

Las virtudes de las plantas medicinales se difundieron más tarde entre los griegos, y después en el mundo occidental antiguo con los estudios de Hipócrates 600 A.C. y los de Teofrasto de Eresus, Galeno y Celso entre los años 371 a 121 A.C.

Actualmente el empleo de la fitoterapia se sigue practicando en casi todo el mundo en forma de Medicina Indígena, Medicina Tradicional y Medicina Científica (1). La Medicina Indígena se usa frecuentemente en Africa y América del Sur. La Medicina Tradicional se practica ampliamente en los países de la China, India, Japón y Vietnam, entre otros; en los que se emplea directamente el té medicinal de polvos preparados. La Medicina de tipo Científico, aunque su uso es modesto, se practica en algunos países europeos como Inglaterra, Italia, Alemania, Bélgica, Holanda, Francia; en Estados Unidos y Canadá, mediante la extracción de los principios activos para uti

lizarlos directamente o aprovecharlos para la síntesis de otras drogas.

Independientemente del tipo de medicina que utilizan los diferentes pueblos, la preocupación fundamental siempre será la de cómo solucionar sus problemas en relación al binomio "salud-enfermedad". Paralelamente a esta preocupación podría decirse que igualmente importante ha sido el hecho de cómo regular su crecimiento poblacional. En este sentido, diversas investigaciones han permitido el desarrollo y el establecimiento de diferentes métodos anticonceptivos como: la práctica del ritmo y la interrupción del coito (3,4), anticoncepción a nivel vaginal (5,6), a nivel intrauterino mediante el uso de dispositivos inertes o bioactivos (7-9). El empleo de hormona por vía oral o inyectados (10-12). Se incluyen además los métodos permanentes o quirúrgicos (13,14). Sin embargo, diversos estudios en anticoncepción han revelado que no obstante a las diferentes alternativas para regular la fertilidad, a la fecha no se cuenta todavía con un método que ofrezca plenamente seguridad, eficiencia, confiabilidad y con un mínimo de efectos indeseables para la pareja e inclusive para el producto.

La anticoncepción masculina no ha recibido mucha atención comparada con el gran número de investigaciones relacionadas con la anticoncepción en la mujer. Sin embargo, estudios recientes demuestran que mediante el uso de productos vegetales no hormonales podría regularse la fertilidad en el varón, a la vez se reduciría significativamente efectos colaterales (15-17).

El uso de algunos productos vegetales con fines anticonceptivos ha provocado diferentes efectos sobre el sistema reproductor masculino como; modificación de la cantidad y calidad del semen. Entre los productos más utilizados con este fin tenemos; Tripterygium wilfordii que altera el proceso de maduración del espermatozoide en el epidídimo (16), Hibiscus rosa sinensis y Aristolochia indica alterando la espermatogenesis (19). El gossipol y Echeveria gibbiflora alterando la motilidad del espermatozoide humano eyaculado (20,21); Phytolacca dodecandra y algunas plantas indias presentan actividad espermicida (22,23). El efecto del gossipol, hace posible que este fármaco pudiera ser utilizado como un agente con actividad antifertilizante (24-26).

De manera similar, publicaciones recientes sugieren la posibilidad de alterar específicamente la viabilidad y cantidad de espermatozoides a nivel epididimario en forma reversible y con un mínimo de efectos indeseables, mediante la utilización de glucósidos de origen vegetal (16,27), con dosis menores a las empleadas clínicamente en los tratamientos de ciertas enfermedades de la piel, del hígado y artritis (28,29).

CARACTERISTICAS DE Bursera fagaroides.

Para la realización del presente trabajo, se colectó la planta entre las poblaciones de Capula y Quiroga en el Estado de Michoacán, la identificación taxonómica se llevó a cabo en el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara, siendo la siguiente:

DIVISION: Angiosperma.
 SUBDIVISION: Dicotiledona.
 ORDEN: Geraniales.
 FAMILIA: Burseraceae.
 GENERO: Bursera.
 ESPECIE: fagaroides.

Al Orden de las Geraniales pertenece la familia Burseraceae, la cual se caracteriza por agrupar árboles o arbustos, generalmente resinosos, con las hojas alternas, rara vez opuestas, pinadas o trifoliadas, sin estípulas. Flores actinomorfas, hermafroditas o uni---sexuales, pequeñas y verdosas. Cáliz de 3-5 sépalos valvados corolla de 3-5 pétalos, rara vez ausentes, libres o unidos en forma variable, imbricados o valvados, disco presente. Estambres en número igual o doble que los pétalos, con los filamentos libres y anteras biloculares, de dehiscencia longitudinal. Ovario súpero, 3-5 carpelar 3-5 locular, con 2 óvulos, rara vez uno sobre placentas axilares. Frutos drupáceos o indehiscentes, o seco y entonces dehisc---centes por valvas, con 1-5 huesos monospermos.

Esta familia consta de unos 20 géneros y más de 500 especies distribuidas principalmente en América, África y Asia tropical. Comprende especies de importancia económica, de las que utilizan las resinas y gomas para la fabricación de cementos y barnices.

La Bursera fagaroides conocida vulgarmente en algunas regiones como copalillo o cuajote, es un arbusto o árbol de talla baja, con ramas lisas y oscuras, cuya corteza se desprende en forma de lámina delgada. Hojas imparipinadas, con 5-7 foliolos oblongos, los inferiores de unos 2 cm. los superiores de 3, el apical algo mayor, la cara superior rugosa, con las nervaduras hundidas, la inferior densamente tomentosa con las nervaduras prominentes. Frutos de 8-9 mm. Florece por el mes de julio (30), (fig. 1).

EL SEMEN HUMANO.

El semen humano normal, está constituido por dos fases, una líquida llamada plasma seminal y otra celular compuesta por los espermatozoides, los cuales generalmente están contaminados con cantidades variables de leucocitos, células epiteliales de descamación, granulaciones de origen desconocido y bacterias no patógenas en cantidades moderadas. El plasma seminal es un fluido con gran cantidad amortiguadora que contiene diversos nutrientes para los espermatozoides y mantiene la concentración de éstos entre 50 y 150 millones de células por mililitro en un volumen promedio de 3 ml. de eyaculado (31-33). El semen presenta características particulares y puede

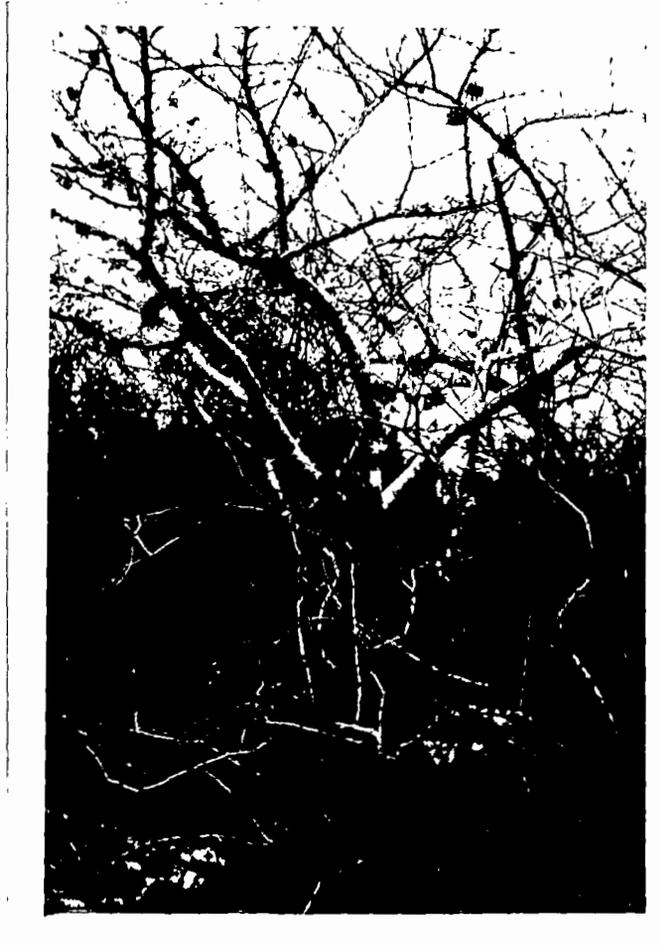


Fig. 1. Planta de Bursera fagaroides.

de tener variaciones aún del mismo individuo. Los dos componentes - del semen son diferentes en su origen, composición y función. El - plasma seminal se forma por la contribución de las secreciones de - las glándulas sexuales accesorias del aparato reproductor masculino - (31). Las secreciones de estas glándulas no son vertidas al tracto genital masculino simultáneamente, sino que lo realizan de una mane- ra bien conocida (34).

La formación del plasma seminal se lleva a cabo de la siguiente mane- ra: primero, son enviadas las secreciones de las glándulas de Cowper y de Littré, cuya combinación constituye un volumen total de 0.1 a - 0.2 ml. Se cree que éste fluido tiene una función lubricante; muy -- poco se sabe de su composición bioquímica, habiéndose solamente repor- tado que es rico en mucoproteínas. La segunda secreción es la pros- tática que contribuye con aproximadamente 0.5 ml. del volumen total del semen; este fluido se puede distinguir por la ausencia de azúcares reductores y altas concentraciones de calcio, zinc, espermina, B-glu- coronidasa, B-amilasa, fosfatasa ácida, ácido cítrico y plasmalógenos. La secreción prostática es seguida por los fluidos ricos en esperma-- tozoides del ampúla y del epidídimo. La última y más voluminosa por- ción del fluido se deriva de las vesículas seminales constituidas por la mayor parte del eyaculado con 2 a 2.5 ml. del volumen y está carac- terizado por la presencia de azúcares reductores, particularmente --- fructuosa y concentraciones elevadas en potasio, prostaglandina y pro- teína (31).

Tradicionalmente se había considerado al plasma seminal como el medio

natural de transporte de los espermatozoides hacia el tracto reproductor femenino y solo recientemente se ha tratado de considerar las características bioquímicas del plasma seminal para valorar la fertilidad en el varón. Usualmente la valoración de la fertilidad masculina se ha basado en exámenes de la fase celular del semen. Los valores de zinc, ácido cítrico y fosfatasa ácida se ha considerado como parámetros específicos de funcionalidad de la glándula prostática; y las concentraciones de fructuosa constituyen el indicativo clínico de funcionalidad de las vesículas seminales. En base a estos estudios se ha logrado establecer que si los patrones de actividad secretora y composición bioquímica se modifican, esto trae consigo problemas muy serios de fertilidad en el hombre (34,35).

Los estudios de la composición química del plasma seminal humano normal han revelado una gran complejidad. El plasma seminal contiene varios iones: zinc, calcio, sodio; aminoácidos, lípidos, carbohidratos, lipoproteínas, glucoproteínas y enzimas. Algunos de estos componentes normalmente se encuentran en concentraciones muy elevadas en comparación a las encontradas en otros fluidos corporales. Las funciones de los constituyentes más característicos del plasma seminal son aún desconocidos e incluso es probable que existan otros componentes de relevancia bioquímica que no se han descubierto y que pudieran tener implicaciones directas o alguna relación con los problemas de infertilidad masculina (31,34).

Se ha demostrado que la composición bioquímica del plasma seminal determina en gran parte los cambios de movilidad, sobrevivencia, me-

tabolismo y composición química del espermatozoide (36,37). También se ha demostrado que la interacción del plasma seminal con el espermatozoide promueve una eficiente penetración de la célula al moco -- servical (38). En consecuencia, parece ser que la importancia del plasma seminal no se reduce simplemente a transportar los espermatozoides a través del tracto genital masculino.

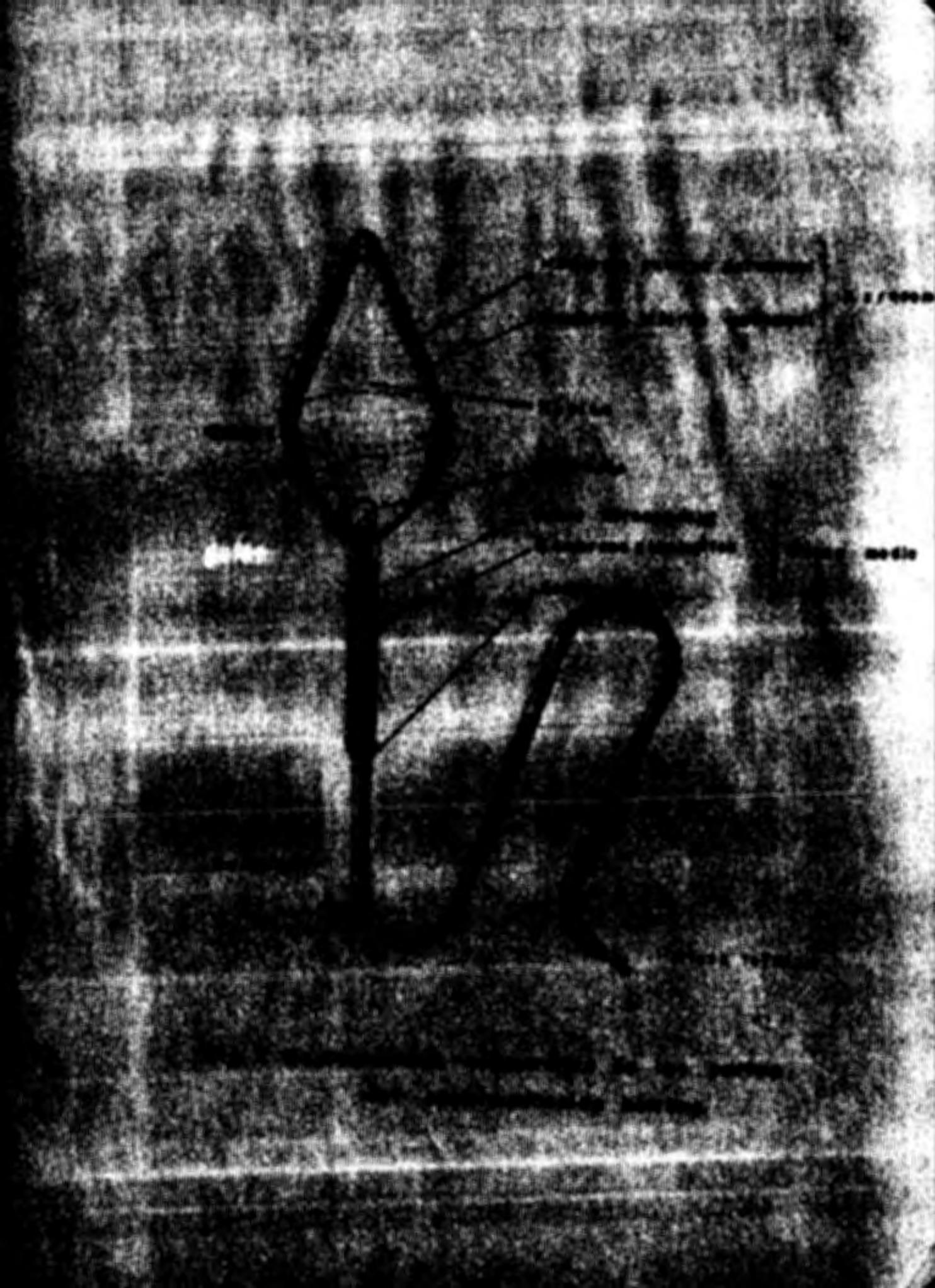
Los espermatozoides, parte celular del semen son producidos en el -- testículo, el cual lleva a cabo dos funciones diferentes pero relacionadas entre sí, la función exocrina que consiste en la producción y almacenamiento de espermatozoides durante el transcurso de diferenciación celular llamado espermatocitogenesis; la función endócrina -- que consiste en la producción y secreción de hormona, principalmente andrógenos.

En el epidídimo los espermatozoides experimentan cambios de orden -- bioquímico, metabólico, estructural y biológico durante el proceso de la maduración epididimaria, con los cuales adquieren la capacidad -- fértil. El espermatozoide humano maduro está constituido por cabeza, anillo o capuchón cefálico, incluido el acrosoma denso en su margen -- anterior. La cabeza incluye el DNA, o material genético. El acrosoma contiene hialuronidasa, una enzima que facilita el paso de espermatozoides entre las células que rodean al óvulo, así como enzimas -- lisosomales como: fosfatasa ácida, proteinasa ácida, acrosina amino -- hidrolasa y ATPasa. Las actividades respectivas de las enzimas favorecen el proceso de fecundación. La pieza intermedia, que está separada de la cabeza por un cuello estrecho incluye un centro de filamentos

longitudinales rodeados por una vaina mitocondrial y se ha pensado - que de él depende la regulación de los movimientos de la cola. La - cola tiene dos filamentos centrales y nueve filamentos dobles perife- ricos (disposición idéntica a la de un cilio) englobados por una ca- pa delgada de citoplasma salvo en la punta de la cola en que no la - incluye (39), (fig. 2).

En base a las características del semen, se ha propuesto la siguien- te nomenclatura clínica para la clasificación de los pacientes (40):

- NORMOZOOSPERMIA: Entre 50 y 150 millones de espermatozoides por -
mililitro.
- OLIGOZOOSPERMIA: Menos de 20 millones de espermatozoides por mili-
litro.
- AZTENOZOOSPERMIA: Menos del 60% de movilidad de los espermatozoides.
- OLIGOASTENOSPERMIA: Menos de 20 millones de espermatozoides por mili-
litro y menos del 60% de movilidad.
- AZOOSPERMIA: Cero espermatozoides.
- NECROZOOSPERMIA: Espermatozoides inmóviles.
- TERATOZOOSPERMIA: Más del 40% de espermatozoides anormales estruc-
turalmente.
- POLIZOOSPERMIA: Más de 250 millones de espermatozoides por milili-
tro.



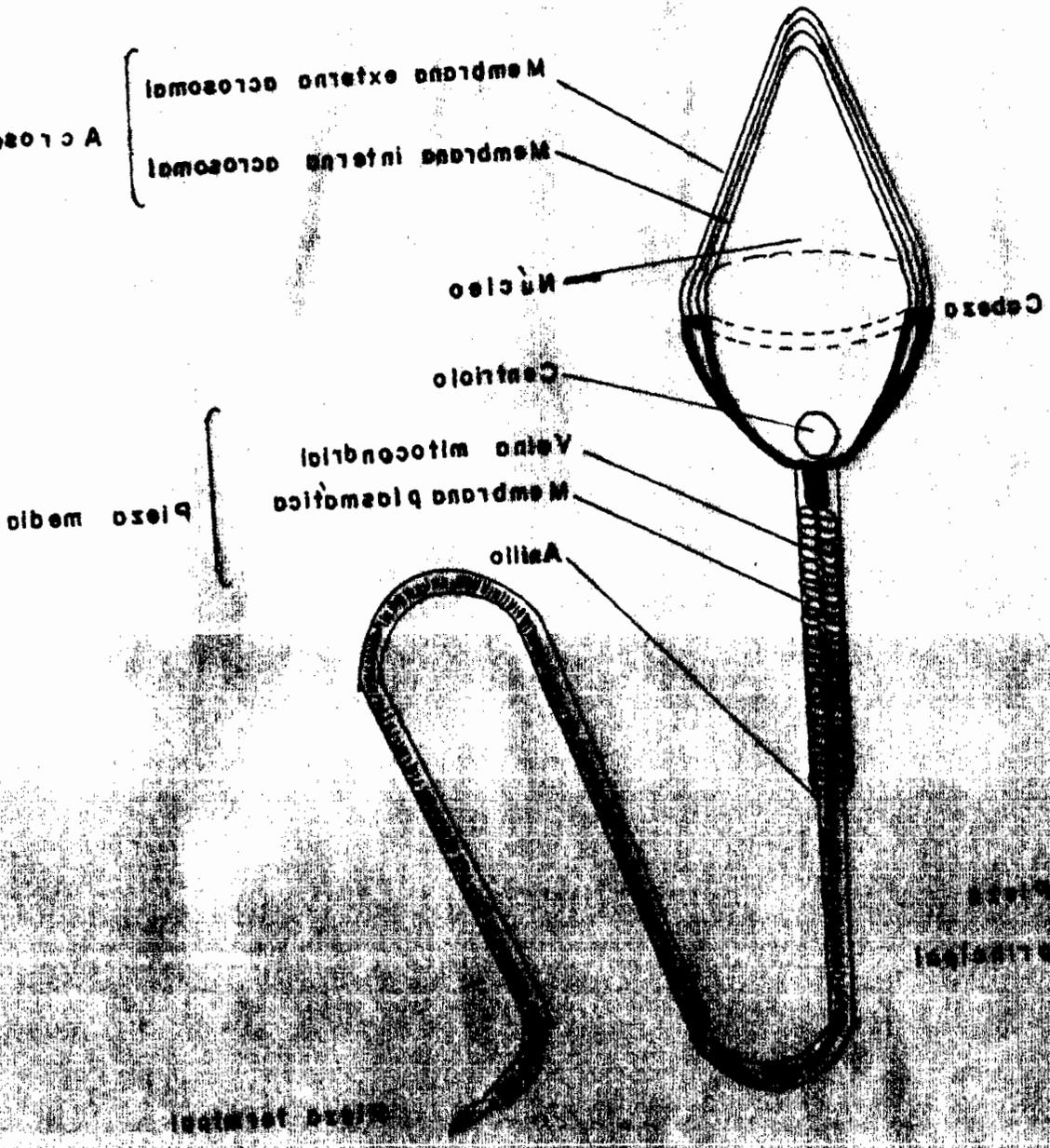


Fig. 2 Representación esquemática de los partes del espermatozoide humano

H I P O T E S I S .

Considerando la motilidad progresiva como una de las características más importantes relacionadas con la fertilidad de los espermatozoides y habiéndose establecido la actividad antifertilizante de preparaciones ricas en glucósidos en el varón (27), así como la demostración de la presencia de estos componentes en algunas plantas Burseraceas (30); los extractos de Bursera fagaroides produzcan -- alteraciones en la motilidad progresiva y en la viabilidad de los espermatozoides eyaculados de humano y de otros mamíferos y consecuentemente un efecto antifertilizante.

O B J E T I V O .

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de extractos crudo acuoso y etanólico de Bursera fagaroides en espermatozoides eyaculados de humano y de otros mamíferos.

MATERIAL Y METODOS.

Hexano normal (MERCK).

Etanol (MERCK).

Sulfato de zinc (MERCK).

Hidróxido de sodio (Baker).

REACTIVOS PARA DETERMINAR AZUCARES TOTALES.

Antrona 0.2 g (MERCK).

Acido sulfúrico 100 ml. (MERCK).

Agua desionizada (Productos selectropura).

Etanol 30 ml. (MERCK).

REACTIVOS PARA DETERMINAR HEXOSAMINAS.

Solución 10 mM de N-acetil D-glucosamina (Sigma).

Acido clorhídrico 0.6 M. (MERCK).

Nitrito de sodio al 2.5% (Baker).

Sulfamato de amonio al 12.5% (MERCK).

Hidrocloruro de 3-metil-2-benzotizolinona hidrozona al 0.,25%
(Sigma).

Cloruro férrico anhidro al 0.5% (MERCK).

REACTIVOS PARA DETERMINAR ACIDO URONICO.

Glucoronalactona 0.005% (MERCK).

Tetraborato de sodio 0.025M. en ácido sulfúrico (MERCK).

Carbazol al 0.125% en etanol (Sigma).

SOLUCION AMORTIGUADORA RINGER KREBS (SARK).

KH_2PO_4 0.154 M. (MERCK).

MgSO_4 0.154 M. (Sigma).

NaHCO_3 0.154 M. (Sigma).

KCl 0.154 M. (MERCK).
NaCl 0.154 M. (MERCK).
Piruvato de sodio 0.2 mM. (Sigma).
Lactato de sodio 21.6 mM (Sigma).

SOLUCION PARA CONTAR CELULAS.

Formol 1% (MERCK).

Citrato de sodio al 2.9% (MERCK)

Agua desionizada (Productos selectroplura).

SOLUCION FIJADORA.

Paraformaldehido 2% (MERCK).

Glutaraldehido al 25% (Sigma).

Cacodilato de sodio 0.2 M. pH=7.3 (MERCK).

Agua bidestilada (Productos selectropura).

Ajustar a pH=7.3.

COLORANTE.

Azul de tripano.

CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA.

Placas de celulosa (MERCK) No. 5730 5X10 cm. 0.1mm. sin revelador para fluorescencia.

Butanol (MERCK).

Acido acético (MERCK).

Sephadex G-10 (Pharmacia fine chemicals).

ROTAVAPOR (Sientif Thelco 188).

CENTRIFUGA (Sorvall GLC-1).

ESPECTROFOTOMETRO (Coleman G_a²⁰ Linea Junio II-A).

MICROSCOPIO (Zeiss).

VORTEX (Genie M 550-G)

CAMARA de Neubauer.

DESMINERALIZADOR (Crystalab CL-5).

MUFLA (Thermolyne F-G125 M).

THERMAL (Hycel).

M E T O D O L O G I A .

Para la realización del presente trabajo se colectaron plantas de Bursera fagaroides cerca de las poblaciones de Capula y Quiroga, en el Estado de Michoacán, la identificación taxonómica se llebo a cabo en el Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara.

OBTENCION DEL EXTRACTO CRUDO ACUOSO.

En el laboratorio procedimos a desfoliar el tallo y a separar y --- fraccionar la corteza en trozos en forma de tiras; se colocan 100 g. de estas tiras en un vaso de precipitado cubierto con papel alumi-- nio y sellado con cinta adhesiva, se congelaron a -20°C. durante -- 24 horas. Después de la descogelación; se presionó para obtener el Extracto Crudo Acuoso (29) que fue almacenado a -20°C.

EXTRACCION SELECTIVA CON ALCOHOLES.

De cada colecta se utilizaron 400 g. de corteza finamente secciona-- da, para hacer más eficiente la extracción y se hicieron extraccio-- nes sucesivas, primero con hexano normal por espacio de 2 horas a -- una temperatura de 52°C., y se filtró (Extracto I). El residuo se reextrajo tres veces más en etanol al 80% por 4 horas cada vez a -- 60°C. Se combinaron los extractos etanólicos para formar el Extrac-- to II; el cual se guardó en congelación por 24 horas lo que produjo un precipitado, el que fue separado mediante centrifugación a 4 000 rpm. por 15 minutos y se concentró eliminando el disolvente a pre-- sión reducida y 60°C. El precipitado se colocó en una caja de Pe-- tri a 60°C. para eliminar la humedad y conocer su peso seco.

SEMIPURIFICACION DEL EXTRACTO ETANOLICO.

El material concentrado (Extracto II) se sometió a semipurificarse - utilizando $ZnSO_4$ al 10% y NaOH al 0.5N.

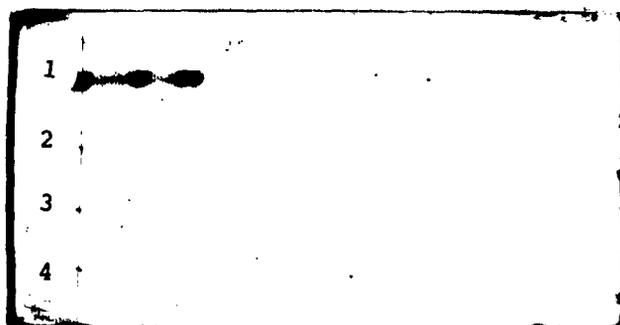
Dos gramos de extracto concentrado se disolvieron en 70 ml. de etanol al 5%, se adicionaron 10 ml. de $ZnSO_4$ agitando vigorosamente y dejando reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos, inmediatamente después se agregaron 11 ml. de NaOH con agitación vigorosa produciéndose la formación de un precipitado después de 5 minutos de reposo, el cual fue eliminado por centrifugación a 4 000 rpm. por 15 minutos. En el sobrenadante se analizó el grado de pureza por cromatografía en placa fina de gel de celulosa con un sistema de elución para glucósidos que consistió en: butanol: ácido acético, agua 16:4:4 (v/v), (fig. 3). Además en el sobrenadante obtenido se cuantificaron los siguientes compuestos: azúcares totales, hexosaminas y ácido urónico por los métodos fotocolorimétricos correspondientes. Estos compuestos también fueron cuantificados en el extracto etanólico concentrado sin defecar.

AZUCARES TOTALES.

METODO Y FUNDAMENTO.

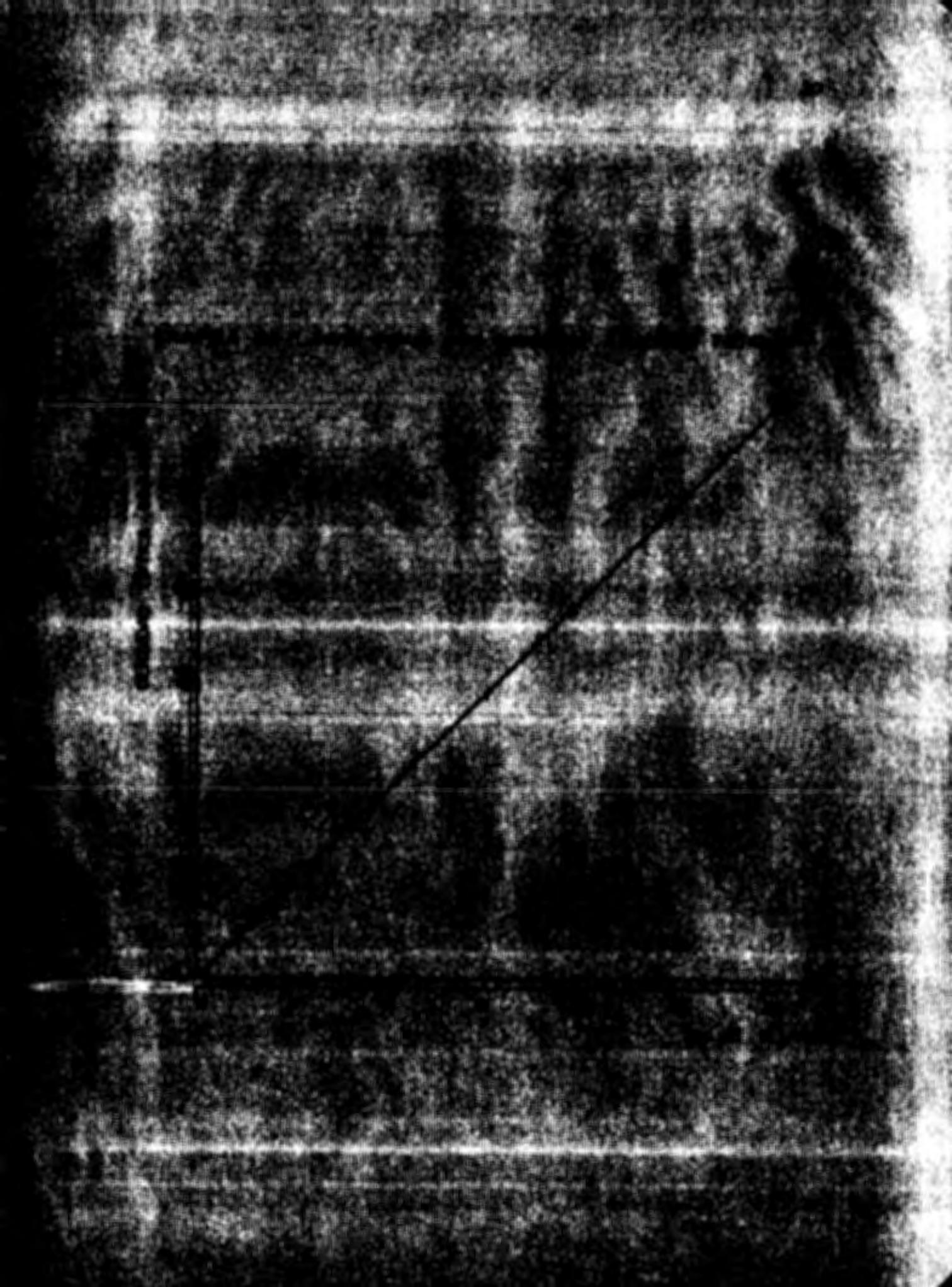
La determinación de los azúcares totales se realizó mediante el método de Hewitt (41), el cual se basa en la reacción entre los carbohidratos con el reactivo de antrona. La intensidad de color del cromóforo formada, es directamente proporcional a la cantidad de carbohi-

Cromatografía en placa delgada con
sistema de elución: butanol, ácido
acético, agua; 16:4:4. (v/v).

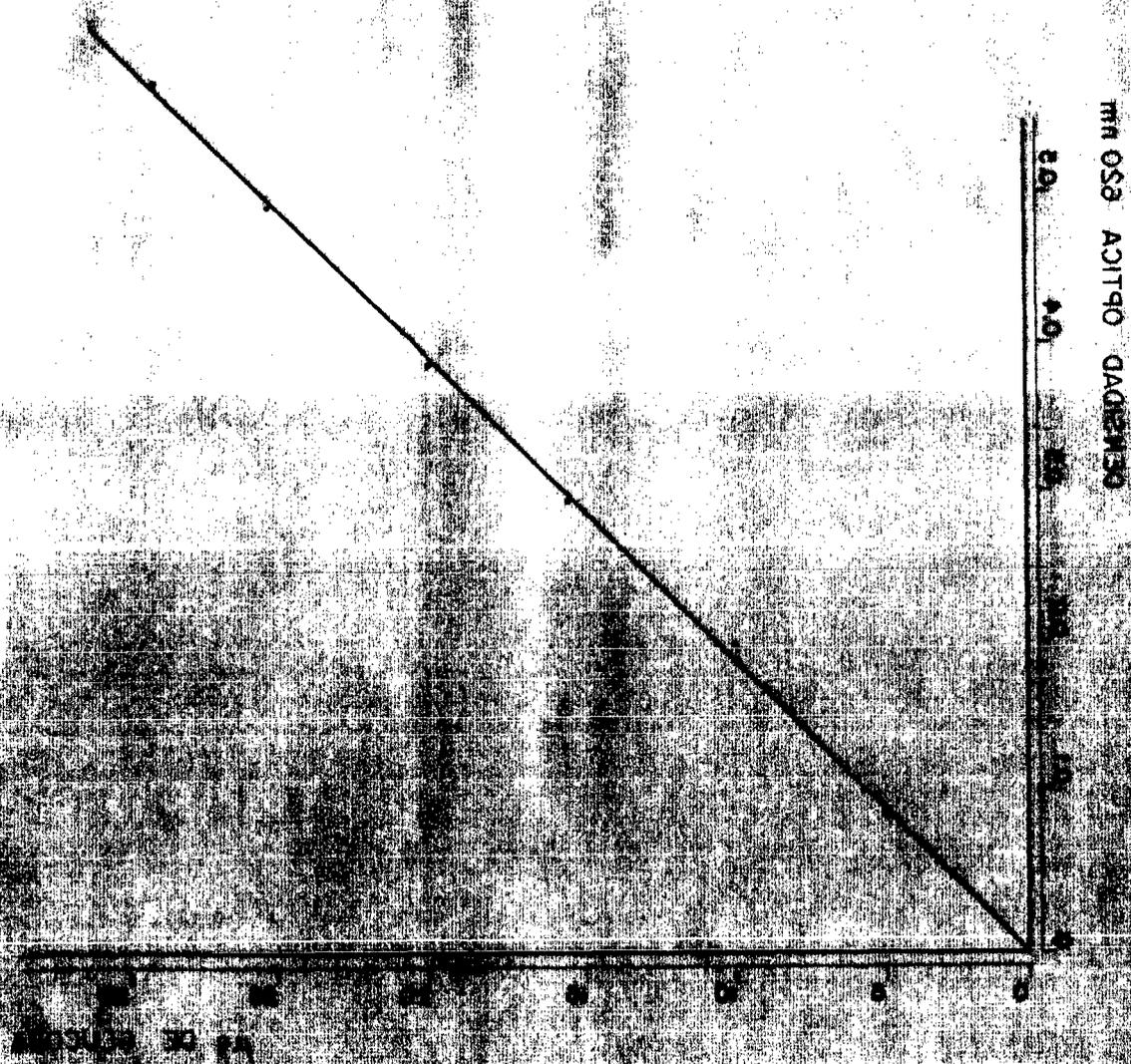


1. Extracto etanólico total.
2. Defecado con sales de Zn y Na.
3. Defecado y concentrado en Sephadex G-10
4. Subproducto de filtración con Sephadex G-10.

Fig. 3. Cromatograma en placa fina.



GRAFICA No. 1. Curva patrón para encontrar AZÚCARES TOTALES

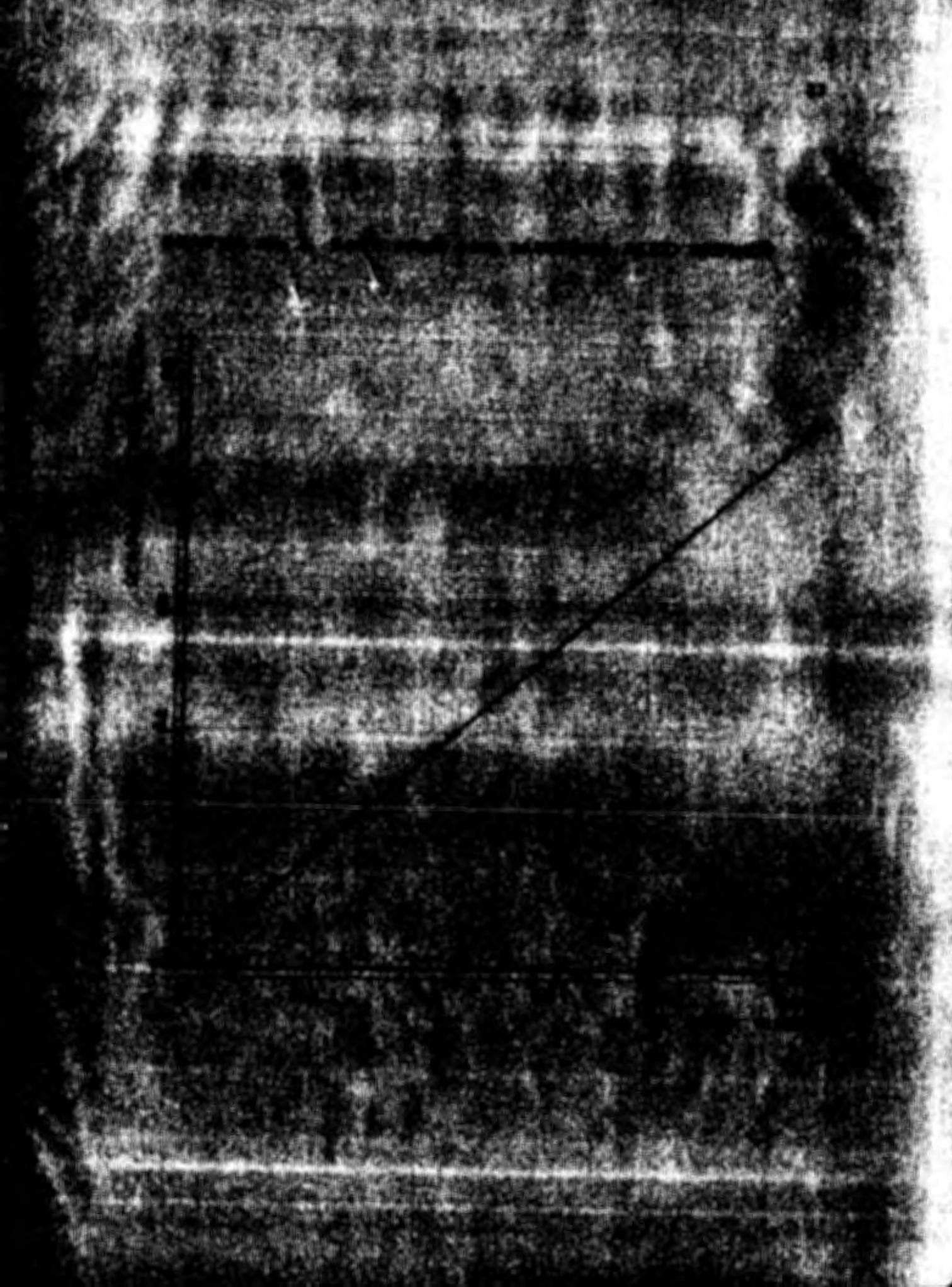




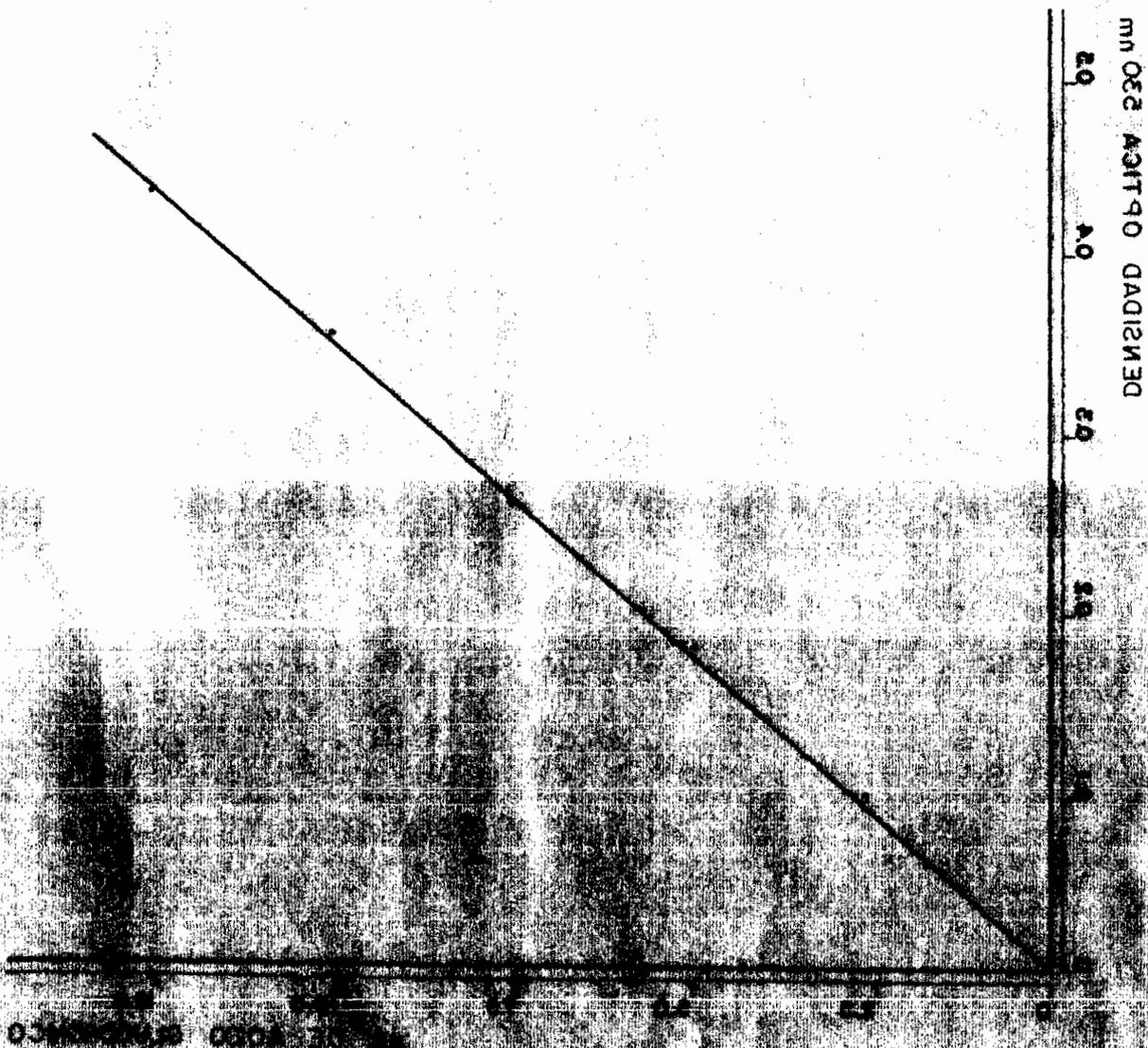
GRAFICA No. 5. Curva patron para coeficiente HEXAMINAS



cuya intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de ácidos urónicos y presenta una longitud de onda máxima de -- absorción de 530 nm. La gráfica No. 3 muestra la curva patrón de -- este método.



GRAFICA No. 3. Curva patrón para cuantificar ACIDO URONICO



SELECCION DE LAS MUESTRAS DE SEMEN HUMANO.

Se emplearon muestras de semen recién eyaculado por masturbación de sujetos sanos, clínicamente fértiles, que acudieron al Hospital de Ginecología del Centro Médico del Instituto Mexicano del Seguro Social, para esterilización por vasectomía. En todos los casos el tiempo de abstinencia sexual previo a la colecta las muestras fue de por lo menos tres días.

Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos, para permitir su licuefacción, e inmediatamente después se hicieron las espermatobioscopías correspondientes, para determinar los siguientes parámetros:

- a) **GRADO DE LICUEFACCION:** Las muestras que durante los treinta minutos no licuaron perfectamente, no fueron considerados para el estudio.
- b) **VOLUMEN:** El volúmen fue siempre mayor o igual a dos mililitros por eyaculado.
- c) **MOVILIDAD PROGRESIVA:** Se consideró siempre mayor o igual al 60%.
- d) **pH:** Las variaciones aceptadas de pH fueron entre 7.3 y 7.6.
- e) **GRADO DE CONTAMINACION:** Las muestras que presentaron más de 7 células diferentes a los espermatozoides en el campo de observación al microscopio óptico fotónico (500 aumentos) fueron descartadas de las normales.
- f) **NUMERO DE ESPERMATOZOIDES:** El número de espermatozoides de las muestras seleccionadas como normales fue mayor o igual a 50 millones por mililitro de eyaculado.

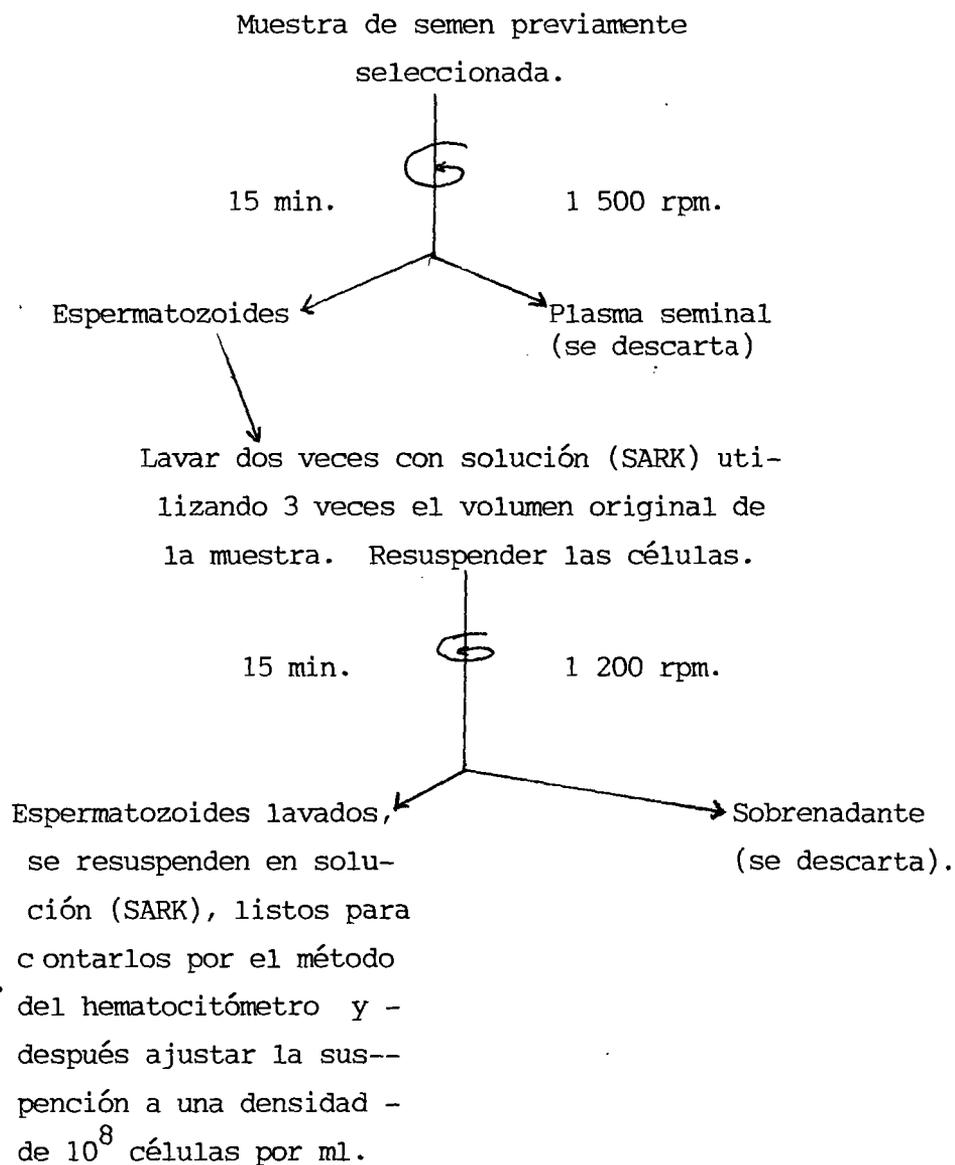
PREPARACION DE LOS ESPERMATOZOIDES LAVADOS.

Las células fueron separadas del plasma seminal por centrifugación durante 15 minutos a 1 500 rpm. El sobrenadante fue retirado con pipeta Pasteur y sin resuspender las células; inclinando el tubo se adicionó el triple del volumen original de solución amortiguadora Ringer Krebs (SARK) y se retiró con mucho cuidado utilizando una pipeta Pasteur, este lavado se hizo por dos veces con el fin de eliminar al máximo restos de plasma seminal y en seguida el precipitado se resuspendió en un volumen original de la muestra con solución amortiguadora (SARK). Se centrifugó por segunda vez a 1 200 rpm. por 15 minutos, se retiró el sobrenadante y se agregó un volumen original de la muestra de solución amortiguadora (SARK) para contar los espermatozoides (Esquema No. 1).

El número de espermatozoides se determinó por el método del hematocitómetro (44). Este método utiliza la cámara de Neubauer y la micropipeta para glóbulos blancos con la que se aspira la suspensión celular hasta la marca de 0.5 y después se llena la micropipeta hasta el aforo de 1.1, con solución fijadora; la pipeta se agita en el vórtex para resuspender adecuadamente los espermatozoides, posteriormente se eliminan las tres primeras gotas antes de llenar la cámara de Neubauer, se aplica la muestra en la cámara y se deja reposar 5 minutos para permitir la sedimentación celular: posteriormente se observan al microscopio localizando la cuadrícula para globulos blancos procediendo a contar las células de cada cuadro; se suman, el resultado se multiplica por 20 que es el factor de la dilución empleada, por 5 que es -

ESQUEMA No. 1.

OBTENCION DE LA SUSPENSION DE ES—
 PERMAZOZOIDES LAVADOS CON SOLUCION
 AMORTIGUADORA DE RINGER KERBS
 pH=7.4 (SARK).



la quinta parte de la cuadrícula total para globulos blancos y finalmente por 10 000 para el volúmen de un mililitro de la suspensión celular. De esta manera se obtiene el número de espermatozoides en millones por mililitro.

SELECCION DE LAS MUESTRAS DE SEMEN DE CONEJO.

Se emplearon muestras de semen recién eyaculado de conejos sanos, clínicamente fértiles del Bioterio de la Unidad de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social. Estas muestras se obtuvieron auxiliandose de una vagina artificial (45).

Las muestras se mantuvieron a temperatura de 37°C. por espacio de 30 minutos, permitiendo así su licuefacción, e inmediatamente después se realizaron las espermatobioscopías correspondientes para determinar los siguientes parámetros:

- a) **GRADO DE LICUEFACCION:** Las muestras que durante los treinta minutos no licuaron perfectamente, no fueron consideradas para el estudio.
- b) **VOLUMEN:** El volúmen fue siempre mayor o igual a un mililitro - por eyaculado.
- c) **MOTILIDAD PROGRESIVA:** Se consideró siempre mayor o igual al 70%.
- d) **GRADO DE CONTAMINACION:** Las muestras que presentaron más de 10 células diferentes a los espermatozoides en un campo de observación al microscopio óptico fotónico (500 aumentos) fueron descartadas de las normales.

- e) **pH:** Las variaciones aceptadas de pH fueron entre 7.2 y 7.6.
- f) **NUMERO DE ESPERMATOZOIDES:** El número de espermatozoides de las muestras seleccionadas como normales fue mayor o igual a 120 millones por mililitro.

La preparación y el conteo de espermatozoides eyaculados de conejo, - se llevó a cabo de la misma forma que se trataron los espermatozoides de humano.

OBTENCION DE ESPERMATOZOIDES DE RATA Y RATON.

Para la realización de esta fase fue necesario realizar una disección longitu-transversal de la parte anterior del abdomen (fig. 4). Con mucho cuidado se separaron los epidídimos en los cuales se identificó la cabeza, cuerpo y cola; utilizando ésta última que es donde se encuentran los espermatozoides maduros.

La cola de los epidídimos se colocaron en un vaso de precipitado en - 0.5 ml. de solución amortiguadora (SARK) y se seccionaron finamente - con tijeras de disección; la suspensión obtenida se filtró inmediatamente después en una pipeta Pasteur empacada con fibra de vidrio. -- Para facilitar la filtración se agregaron 0.5 ml. de solución (SARK).

Las muestras se incubaron a 37°C. y se realizaron las espermatobios-- copias para determinar los parámetros siguientes:

- a) **MOVILIDAD PROGRESIVA:** Se consideró siempre mayor o igual al 70%.



a)



b)

Fig. 4. a) Disección de ratón.
b) División del epidídimo.

- b) **pH:** Las variaciones aceptadas de pH fueron entre 7.3 y 7.6.
- c) **GRADO DE CONTAMINACION:** Las muestras que presentaron más de - 4 células diferentes a los espermatozoides en el campo de observación al microscopio fotónico (500 aumentos) fueron descartadas.
- d) **NUMERO DE ESPERMATOZOIDES:** El número de espermatozoides de las muestras seleccionadas como normales fue mayor o igual a 40 millones por mililitro.

Los espermatozoides de rata y ratón se cuantificaron por el método del hematocitómetro (44).

SELECCION DE LAS MUESTRAS DE SEMEN DE CERDO.

Se emplearon muestras de semen recién eyaculado de cerdos clínicamente sanos y fértiles de la escuela de Veterinaria de la Universidad de Guadalajara. Estas muestras se obtuvieron auxiliándose de una hembra artificial.

Las muestras se mantuvieron a temperatura de 37°C por espacio de 69 - minutos, permitiendo así su licuefacción, e inmediatamente después se realizaron las espermatobioscopias correspondientes para determinar - los siguientes parámetros.:

- a) **GRADO DE LICUEFACCION:** Las muestras que durante los 60 minutos no licuaron perfectamente, no fueron consideradas para el estudio.
- b) **VOLUMEN:** El volúmen fue siempre mayor o igual a 240 mililitros por eyaculado.

- c) **MOTILIDAD PROGRESIVA:** Se consideró siempre mayor o igual al -- 70%.
- d) **pH:** Las variaciones de pH aceptadas fueron entre 7.2 y 7.6.
- e) **GRADO DE CONTAMINACION:** Las muestras que presentaron más de 10 células diferentes a los espermatozoides en un campo de observación al microscopio óptico fónico (500 aumentos) fueron descartadas de las normales.
- f) **NUMERO DE ESPERMATOZOIDEOS:** El número de espermatozoides de las muestras seleccionadas como normales fue mayor o igual a 250 mil espermatozoides por mililitro de eyaculado.

La preparación y el conteo de espermatozoides eyaculados de cerdo, se llevó a cabo de la misma forma que se trataron los espermatozoides de humano.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS ETANOLICOS Y SEMIPURIFICADOS.

La actividad biológica de los extractos etanólicos y semipurificados se investigó en espermatozoides eyaculados de humano, cerdo y conejo; así como en espermatozoides de epidídimo de rata y ratón. La actividad fue evaluada mediante los siguientes parámetros:

- a) **Alteración en el patrón de motilidad progresiva de los espermatozoides (45).** Esta característica fue valorada comparando el porcentaje de espermatozoides con desplazamiento progresivo en ausencia (testigo) y en presencia de los extractos, utilizando

un microscopio fotónico normal con aditamentos para contraste -- fase.

- b) **Viabilidad celular (46)**. Se realizaron pruebas de citotoxicidad a diferentes tiempos de incubación en presencia y en -- ausencia (testigo) de los extractos para determinar el porcentaje de daño celular.

Para la realización de ésta serie de pruebas, la suspensión de la -- muestra de espermatozoides fue ajustada a 10^8 células por mililitro. En cada prueba se utilizaron 20×10^6 espermatozoides en un volúmen -- de 180 ul. en presencia de 20 μ l. de los extractos equivalentes a 137 ug. de azúcares totales, obteniendo un volumen total de 0.2 ml.; que fue la cantidad mínima para producir el mayor efecto en espermatozoides de humano, ésta cantidad fue la misma que se utilizó para los espermatozoides de otros mamíferos.

Las pruebas de citotoxicidad para determinar el porcentaje de daño celular, se incubaron los espermatozoides en presencia y en ausencia -- del extracto (control) a diferentes tiempos y a 37°C. Los tiempos de incubación ensayados fueron 30, 60, 90, 120 y 180 minutos. Inmediata mente después de cada tiempo de incubación, se adicionaron 2 gotas de azul de tripano y después de 3 minutos de incubación a 37°C. se agregaron 2 volúmenes de fijador; manteniéndose los tubos a temperatura -- ambiente durante 60 minutos (47). Después de fijados los espermatozoides, se centrifugan a 1 500 rpm. por 15 minutos; se retiró el so-- brenadante y los espermatozoides se resuspendieron en cacodilato de -- sodio para ser lavados mediante dos centrifugaciones sucesivas y se --

guardaron en refrigeración; al día siguiente se determinó la viabilidad observando en el microscopio cinco campos diferentes de cada una de las preparaciones de los diferentes tiempos de incubación. Se contaron las células teñidas (muertas) y las no teñidas (viables) con el fin de determinar el porcentaje de daño celular, comparando estos valores con los obtenidos con preparaciones hechas con los espermatozoides incubados en ausencia (control) del extracto.

RESULTADOS .

De las extracciones selectivas, los disolventes contenidos en los extractos I y II, fueron eliminados a presión reducida con rotavapor. La humedad contenida en el precipitado de congelación fue eliminada en una mufla, por calentamiento continuo a 60°C. hasta logra completa sequedad del precipitado. La Tabla No. 1 muestra los pesos y porcentajes relativos obtenidos en las extracciones correspondientes, observandose claramente que el extracto etanólico contiene la mayor cantidad de las sustancias extraídas de la planta.

En la Tabla No. 2 se muestra los resultados de la composición parcial del extracto etanólico no semipurificado y semipurificado; y presenta los porcentajes relativos de: azúcares totales, hexosaminas y ácido urónico. La semipurificación produjo una marcada disminución no solamente en azúcares totales, sino también en las hexosaminas y ácido urónico; siendo éste el que más disminución presentó. Este tratamiento modificó apreciablemente el aspecto del cromatograma del extracto sin semipurificar, ya que es evidente la ausencia de material en el semipurificado, destacandose solo la presencia de aparentemente tres componentes. (Fig. 3).

ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

Los cambios observados en la motilidad progresiva de los espermatozoides al ser incubados en presencia del extracto sin semipurificar, son mostrados en las figuras números 5, 6, 7 y 8.

TABLA No. 1.

RECUPERACION POR EXTRACCION SELECTIVA Y
PRECIPITACION.

EXTRACTO	CANTIDAD (g)	RENDIMIENTO (%)
ETANOLICO	22.3	5.6
HEXANICO	1.4	0.35
PRECIPITADO DE CONGELACION	3.7	0.92

Los valores representan el promedio de 3 experimentos y en cada uno de ellos se utilizarón 400g. de la planta.

TABLA No. 2.
COMPOSICION PARCIAL DEL EXTRACTO ETANOLICO.

	AZUCARES TOTALES	HEXOSAMINAS	ACIDO URONICO
EXTRACTO ETANOLICO NO DEFECADO	65.2	1.8	11.8
EXTRACTO ETANOLICO DEFECADO	48.5	1.1	4.3

Los valores representan el porciento de los parámetros analizados.



a)



b)

Fig. 5. Espermatozoides de humano.
(a) en ausencia; (b) en presencia
de extracto etanólico. (x 1375).

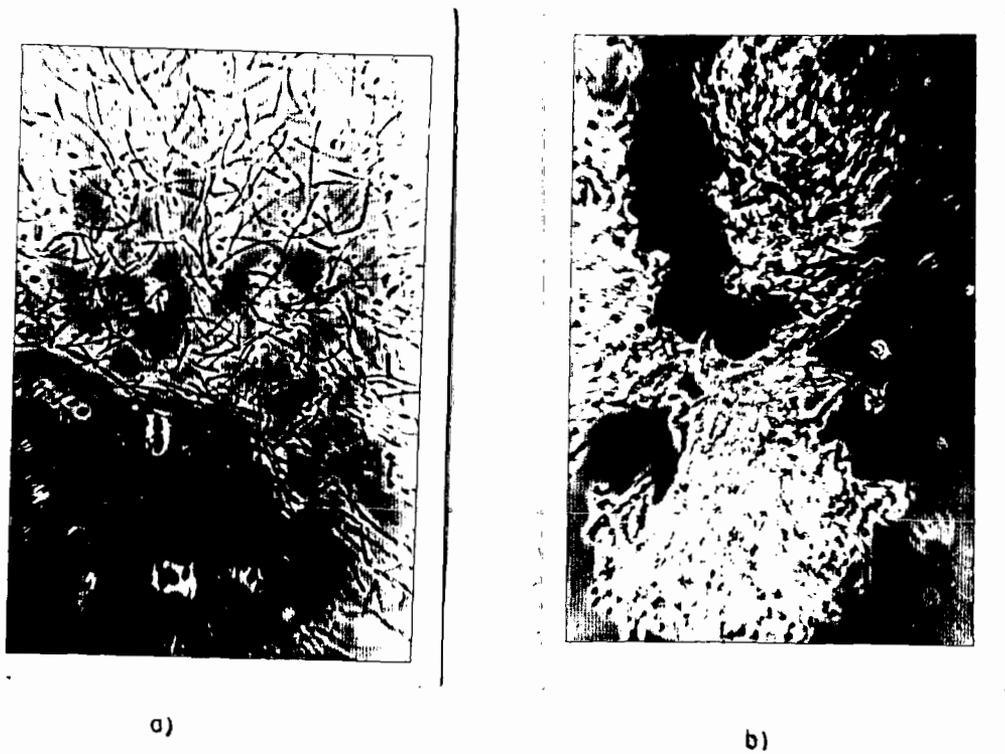


Fig. 6. Espermatozoides de ratón.
(a) en ausencia: (b) en presencia.
de extracto etanólico. (x 343.75)

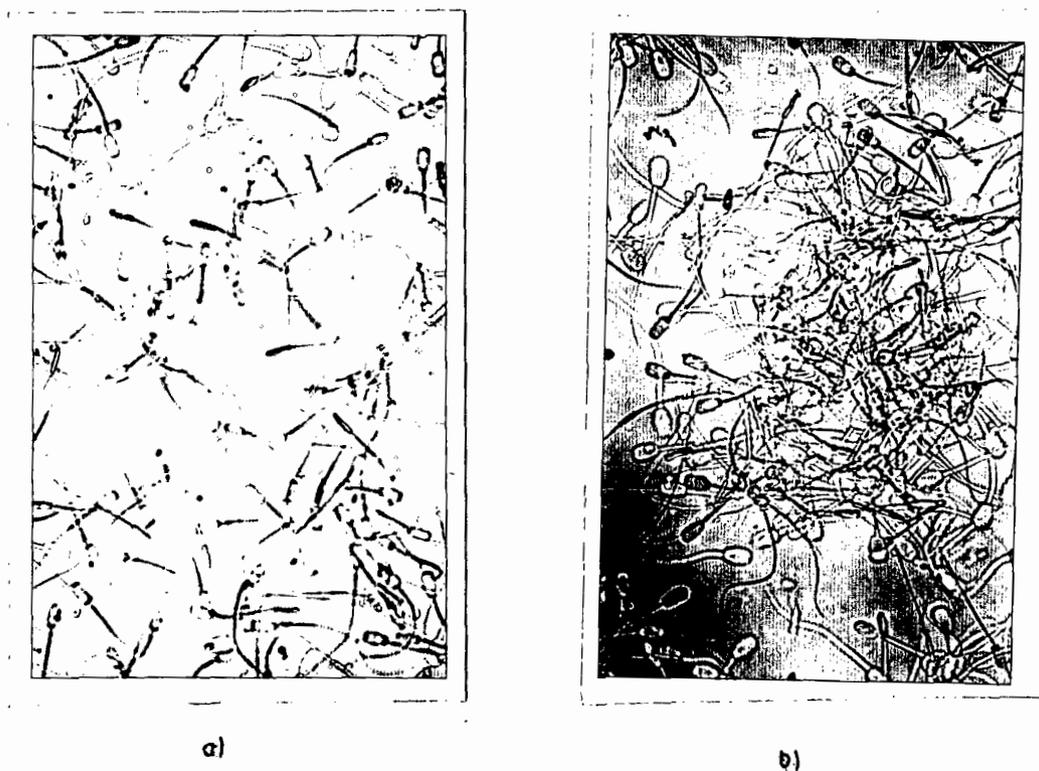


Fig. 7. Espermatozoides de Cerdo.
(a) en ausencia; (b) en presencia
de extracto etanólico. (x 1375)

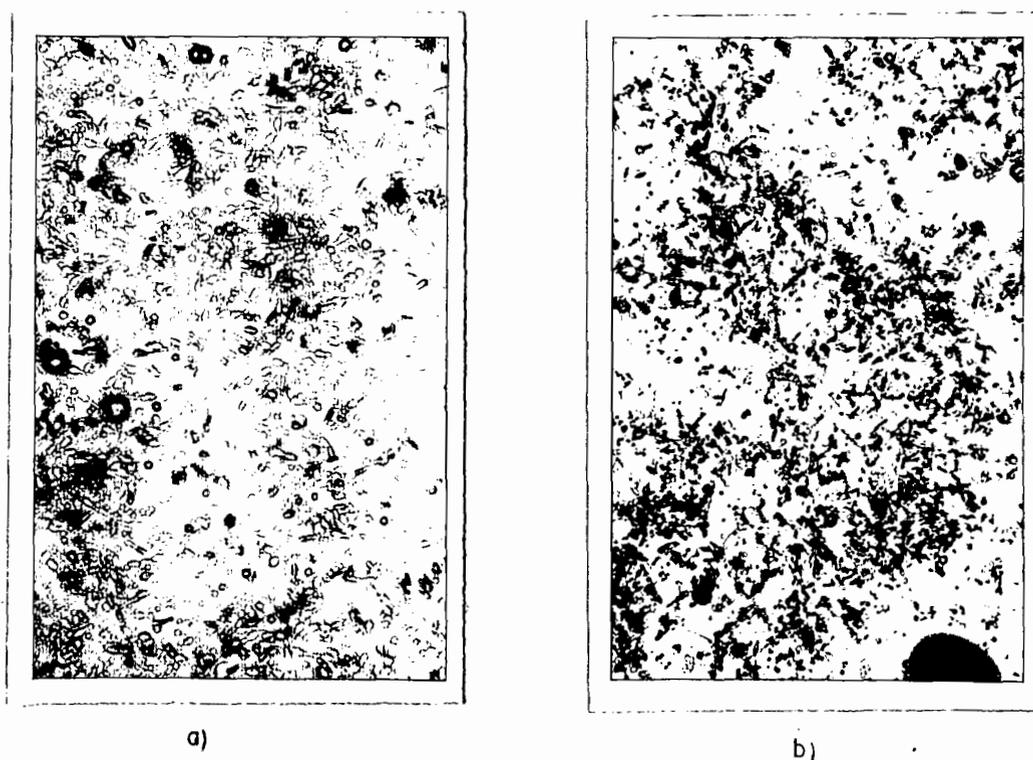


Fig. 8. Espermatozoides de conejo.
(a) en ausencia; (b) en presencia
de extracto etanólico. (x 343.75).

Independientemente de las muestras de los mamíferos utilizados para la elaboración del presente trabajo, después de adicionar el extracto a la suspensión de espermatozoides, en todos los casos se observó una disminución importante de la motilidad progresiva. Después de cinco minutos en presencia del extracto, la inmovilización fue total; así como la aglutinación de los espermatozoides de humano y del epidídimo de ratón. La aglutinación fue menor en espermatozoides eyaculados de cerdo; y fue necesario aumentar 10 veces la concentración de los espermatozoides de conejo. Por otra parte, los espermatozoides de rata mostraron disminuida su motilidad progresiva sin que se produjera aglutinación. Los efectos del extracto semipurificado sobre la motilidad progresiva y aglutinación de los espermatozoides de los diferentes mamíferos, no diferieron de los obtenidos cuando se usó el extracto no semipurificado, razón por la que no se ilustraron los resultados.

Las pruebas de viabilidad se realizaron solamente con espermatozoides eyaculados de humano, después de incubar las células a tiempos diferentes en presencia y en ausencia del extracto sin semipurificar y semipurificado. Bajo estas condiciones experimentales, se observó una disminución importante en la proporción de células viables en comparación a los espermatozoides en ausencia del extracto cuya viabilidad fue del 78%. El comportamiento de disminución fue el mismo, independientemente de utilizar extracto semipurificado en la viabilidad o sin semipurificar. Los resultados son mostrados en la Tabla No. 3 .

TABLA No. 3.

VIABILIDAD DE ESPERMATOZOIDES HUMANOS INCUBADOS
EN EXTRACTOS OBTENIDOS DE Bursera fagaroides.

TIEMPO (min.)	EXTRACTO ETANOLICO NO DEFECADO.	EXTRACTO ETANOLICO DEFECADO.
30	58	56
60	56	55
90	52	52
120	48	46
180	50	48

Los valores son el promedio de tres experimentos
y estan expresadas en porciento.

D I S C U S I O N .

El propósito fundamental de esta parte del trabajo consistió en demostrar la actividad de extractos crudos acuosos y etanólicos sobre la motilidad y viabilidad de los espermatozoides eyaculados de humano y de otros mamíferos como parte de otros estudios dirigidos a anticoncepción masculina utilizando productos de origen vegetal de naturaleza no hormonal (21). El haber seleccionado a Bursera fagaroides para este trabajo fue debido a que algunas Burseras contienen glucósidos y a que estos compuestos han sido descritos como muy activos para producir infertilidad en el hombre en forma reversible (16,27). Una ventaja importante es que las Burseras son de amplia distribución en el territorio nacional, son fáciles de coleccionar y son muy ricas en materiales de síntesis, acumulados principalmente en la corteza la cual es muy fácil de separar.

Fue muy valioso para nosotros el haber encontrado que el rendimiento del material extraíble es excelente y principalmente con la extracción etanólica que es en donde se encontró la mayor cantidad de compuestos y entre ellos los que tuvieron actividad sobre los espermatozoides (Tabla No. 1). En esta parte del trabajo solamente se utilizaron los extractos etanólicos y no así los extractos obtenidos con hexano, que contienen ceras y ácidos grasos.

Para llevar al cabo las valoraciones de actividad biológica, solamente se utilizaron extractos etanólicos después de retirar un precipitado que se formó después de 24 horas de congelación. En ninguno de los tres experimentos realizados, el precipitado de congelación presentó actividad sobre los espermatozoides. En estas valoraciones se

incluyeron extractos semipurificados utilizando sales de zinc y bario como prueba indirecta de que las sustancias activas pudieran ser carbohidratos. Comparativamente no hubo diferencias importantes en los resultados de inmovilización-aglutinación cuando se incubaron los espermatozoides con los extractos semipurificados y sin purificar; tampoco se observaron diferencias en los cromatogramas del extracto semipurificado con el material activo colectado en las fracciones durante la filtración de columna de Sephadex G-10 (Fig. 3); lo cual nos indica que independientemente del método para purificación, se obtienen tres compuestos sin que podamos decir si los tres o solamente uno de ellos es el que produce el efecto.

Con la excepción de los recientes estudios bioquímicos y clínicos relacionados con el efecto antifertilizante del gosipol (48), es escasa la información que existe en la literatura respecto a los datos bioquímicos relacionados con la actividad espermicida y/o antifertilizante de los compuestos activos presentes en las plantas; y más aún en relación a los posibles mecanismos de acción por los cuales los compuestos ejercen su efecto. En el presente estudio se determinaron algunos compuestos en los extractos etanólicos y en las fracciones con actividad inmovilizante y aglutinante, como los posibles responsables, al menos parcialmente de dichas actividades. El 75% lo constituyen carbohidratos entre los que distinguimos hexosaminas, ácido urónico y ácido siálico; de este último solo tuvimos la evidencia de que existe sin determinar la concentración. En el mecanismo de interacción del o los compuestos activos con los espermatozoides posiblemente sea importante la contribución de ácido siálico, pues en algunos experimentos de ----

filtración en columna con Sephadex G-10, al estudiar el perfil de actividad sobre los espermatozoides con las fracciones colectadas; encontramos que, las fracciones con mayor reacción positiva para ácido siálico tuvieron mayor actividad. Esto último parece confirmar el hecho de que el o los compuestos activos son carbohidratos, debido a que los resultados en cuanto a la inmovilización-aglutinación no son diferentes cuando se utilizó el extracto sin semipurificar o el semipurificado con sales de zinc y bario. Además de que este tratamiento permite eliminar macromoléculas y proteínas y no así carbohidratos o complejos ricos en carbohidratos (glucósidos ?) posiblemente del orden de 800 a 1 000 daltons, según revelaron datos preliminares obtenidos al utilizar un marcador de peso molecular de 960 daltons (azul de tripano) y como soporte Sephadex G-10.

Nuestros resultados demuestran que en Bursera fagaroides existen compuestos que tienen un alto grado de actividad inmovilizante y aglutinante, particularmente de los espermatozoides eyaculados de humano y de los obtenidos del epidídimo de ratón. Esta actividad fue menor en los espermatozoides de cerdo y menos aún sobre los espermatozoides de conejo; y con solo alteración en el patrón de motilidad progresiva de los espermatozoides de rata. Este comportamiento diferencial es muy semejante al observado por otros autores en cuanto a la diferente respuesta de inhibición de la enzima Lactato deshidrogenasa-X (LDH-X) por gossipol. Las concentraciones requeridas para inhibir en un 50% la actividad de la enzima en los espermatozoides de humano, conejo y de carnero fueron de 60, 90 y 120 μM respectivamente. De manera similar la inmovilización de los espermatozoides con

motilidad progresiva es otra manifestación fundamental del efecto -- espermicida del gossipol. Este efecto ha sido observado en espermatozoides de cuatro diferentes especies de animales; de esta manera, se ha demostrado que las concentraciones umbrales de respuesta fueron diferentes: 0.2 μM para espermatozoides de humano, de 8 000 μM para los de conejo de 75 y 100 μM para los espermatozoides de rata y de erizo de mar respectivamente (48).

Debido a la mayor sensibilidad de respuesta observada en los espermatozoides eyaculados de humano y de epidídimo de ratón, se abre la posibilidad de continuar el estudio con ratones, para investigar "in vivo" el posible efecto del extracto a nivel testicular o epididimario y en consecuencia los cambios en la cantidad y calidad de los espermatozoides. De esta manera, si resultan positivos los resultados; sería factible proponer en un futuro el empleo de productos obtenidos de estas plantas como recursos con buena posibilidad de éxito para regular la fertilidad masculina.

Aprovechando la baja toxicidad observada al interaccionar el extracto con los espermatozoides, otra alternativa que podría manejarse -- sería producir los efectos del extracto a nivel vaginal. En esta -- práctica de regular la fertilidad, la Medicina Azteca reporta alrededor de 200 especies de plantas de cuyos extractos o infusiones se -- utilizaban como anticonceptivos a nivel vaginal y hasta la fecha son parte de la Medicina Tradicional Mexicana (49,50).

Es muy interesante constatar el interés cada vez en aumento por la -

utilización de diferentes productos de naturaleza no hormonal y con posibilidades de importante actividad anticonceptiva en forma reversible (16,27) y con un mínimo de efectos colaterales indeseables. - En abril de 1985 se inició en Filipinas un proyecto de investigación integrado de cinco años, utilizando plantas medicinales nativas para uso en planificación familiar. El proyecto integrado tiene importancia debido a la necesidad de alternativas para los métodos de planificación familiar que sean seguros, eficaces y más accesibles. Los centros participantes son: La Escuela de Medicina y Farmacia de la - Universidad de Filipinas en Manila, la Escuela de Medicina Veterinaria y el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología (51). Muy relacionado con lo anterior es la reciente creación de la Organización - Internacional para las Ciencias Químicas en Desarrollo (IOCD), esta organización con sede en México forma parte de los grupos interesados en la investigación sobre la regulación de la fertilidad y existen por lo menos en 35 lugares localizados en países desarrollados - y en desarrollo. En el campo de la Planificación Familiar participan en programas cuyo objetivo fundamental es la búsqueda de nuevos agentes para la regulación de la fertilidad y en particular de sustancias con propiedades antifertilizantes para el hombre. Este programa está realizándose en colaboración con el Instituto Nacional de Salud (52).

En México, debido a los crecientes costos de los fármacos, así como la agresividad de algunos aspectos de la Medicina Institucional, cada día se recurre más a la Medicina Herbolaraia, mediante el aprovechamiento de los beneficios curativos de unas 20 000 especies de --- plantas, de las que aproximadamente 2 000 ya se encuentran debidamen

te estudiadas en el país para prescribirse adecuadamente, tanto en sus dosis, como en sus formas de administración. En esta tendencia del uso sistemático de las plantas medicinales, sería importante la participación de un grupo interesado en la reproducción humana con objetivos precisos a la anticoncepción masculina en la que se utilizan productos no hormonales de origen vegetal; aprovechando el hecho de que nuestra medicina herbolaria mexicana quizás la más rica y variada del mundo constituye una fuente abundantísima de posibilidades para la Investigación Biomédica. Es por ello que con esta inquietud se desea continuar con estos estudios para obtener el material científico suficiente que permita establecer una línea nueva de investigación con algunas plantas mexicanas que reúnen cualidades muy interesantes para estos objetivos.

C O N C L U S I O N E S .

1. Los procedimientos de extracción permitieron obtener de la corteza de la planta 7.13% de material del cual el 95% se extrajo con etanol al 80% y de este extracto el 75% corresponde a azúcares totales.
2. El extracto etanólico contiene el material activo de la planta.
3. El efecto de inmovilización-aglutinación fue del 100% y casi instantaneo en espermatozoides eyaculados de humano y en los obtenidos del epidídimo de ratón.
4. Los espermatozoides de cerdo, de conejo y de rata fueron en este orden menos sensibles a el efecto del extracto.
5. La respuesta de inmovilización-aglutinación fue la misma utilizando extractos semipurificados que sin semipurificar.
6. Los extractos crudo acuoso y etanólico obtenidos de Bursera fagaroides contienen por lo menos 3 compuestos de los cuales uno de ellos podría ser utilizado como anticonceptivo.

B I B L I O G R A F I A .

1. Capasso, F., Balestrieri, B., Macolo, N. Actualidad de las --- plantas medicinales. En: Medicina Tradicional III (10); (eds) - Javier Lozoya, Carlos Zalla y Alma Gomez. Editorial Comite Editorial; 4ta. edición, (1980). México.
2. Edmund, W., Katherine, S., Wilson, S. La ciencia de las plantas y su historia. En: Botánica Principios y Problemas. (eds). Edmund, W., Wilson, S. Editorial CECSA. 2da. edición. pp. -- 25-32, (1981). México.
3. Hafez, E.S.E. Male contraception. In: Human Reproduction Conception and Contraception. (ed) Hafez, E.S. Editorial Harper & Row Publishers. 2nd. edition. pp. 843-853. (1979). Detroit, - Michigan.
4. Eduard, S. Coitus interruptus. In: Manual of Family Planning - and Contraception Practice. (eds) Baltimore, Williams and Wilkins. Editorial Calderone MS. 2nd. edition (1970). Detroit, Michigan.
5. Benstein, G.S. Clinical effectiveness of an aerosol contraceptive foam. Contraception 3: 37-42 (1971).
6. Huggins, G., Vessy, M., Favel, R., et al. Vaginal spermicides and large cohort study. Contraception 25: 219-225, (1982).
7. Timonen H. Copper release from copper T. intrauterine devices. Contraception 14: 1-12, (1976).
8. Johnson, A.B., Meness, R.F., Wheeler, R.G. Calcareous deposits formed on IUDs in human exposures. Contraception 14: 506-517 - (1976).

9. Huacuja, L., Delgado, N.M., Aznar, R. Mineral deposits formation in bioactive IUDs. *Adv. Contra. Delv. Sys.* pp. 251-258 -- (1987).
10. Edgren, R.A., Sturtemvan, F.M., Potencies of oral contraceptives. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 125:1029-1033 (1976).
11. Koesawang, S. Injetd long-acting medroxiprogesterone acetate - effect on human lactation and concentrations in mild. *J. Med. - Ascoc. Thai.* 60:57-60 (1977).
12. Vessey, M., Meisler, L., Flavel, R. et al. Outcome of pregnancy in women using different methods contraception. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 86:548-561 (1979).
13. Pardanani, D.S., Patil, N.G., Pawar, H.N. Some gross observations of the epididymides following vasectomy: a clinical study. *Fertil. Steril.* 27:267-272 (1976).
14. Yoon, I.B., King, T.M., Parmley, T.H. A two-year experience with the falope ring sterilization procedure. *Am J. Obstet. Gynecol.* 127: 109-112. (1977).
15. Kamboj, V.P., Setty, B.S., Khanna, N.M. Semen 'coagulation' a - potential approach to contraception. *Contraception* 15: 601-610. (1977).
16. Shao-Zhen Qian, Chang-Qi Zhong, Ye Xu. Effect of *Tripterigium wilfordii* hook f. on the fertility or rats. *Contraception* 33: - 105-110. (1986).
17. Kholkute, S.D. Effect of *Hibiscus rosa sinensis* on spermatogones and accessory reproductive organs in rats. *Planta Medica.* - 31: 127-135 (1977).

18. Pakrashi, A., Packasi, P.L. Antiespermatogenic effect of the -
extract of Aristolochia indica linn. on male mice. In. J. ---
Exp. Biol. 15: 256-259 (1977).
19. Pakrashi, A., Sanyal, S., Benerjee, R., Sen. N.R. Effect of ---
Malvaviscus konzattii flower extract on male fertility. Contra-
ception. 31: 101-108 (1985).
20. Lañña, N.R. Stuiies on the male antifertility agent-gossypol acid
acetic II. Effect of gossypol acetic acid on the motility and -
ATPasa activity of human spermatozoa. Andrología 13:75-78 (1981).
21. Huacuja, L., Toboada, J., Ortega, A. et al. Inmovilization and
agglutination effect of Echeveria gibbioflora I. Crassulacea --
agucous crude extrac on human spermatozoa. Ad. in Contraceptive
Deliveri Systems. II: 229-236. (1985).
22. Stolzenberg, S.J., Parkhurst, R.M. Spermicidal actions of extracts
and compounds from Phytolaca dodecandra. Contraception. 10: --
135-143 (1974).
23. Setty, B.S., Kamboj, V.P., Khanna, N.M. Secreening of indian --
plants for biological activity. Part. VIII. Spermicidal activity.
Indian. J. Exp. Biol. 15: 231-232 (1977).
24. Xue (Shieh). Antifertility effect of gossypol on the germinal -
spithelium of the rat testes. A cytological, autoradiographical
an ultrastuctural observation. Sci. Sin. 9:915-928 (1979).
25. Chen, X.M., Li, W.Y., Xue, S.P. The effect of gossypol on latate
dehydrogenase isoenzime-x (LDH-x) of human spermatozoa. Acta. -
Acad. Med. Sin. 5: 223-226 (1983).

26. Xue She-Pu. Antifertility effect of gossypol and its mechanism of action. In: *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*. Chang, H.M., Yeung, H.W., Tso, W.W., and Koo, A. (eds); World -- Scientific Publ. Co. (Ed). pp. 625-638. (1985). Singapore.
27. Shao Zhen Qian. Tripterygium wilfordii, a chinese herb effective in male fertility regulation. *Contraception* 36: 335-343. (1987).
28. Dominguez, X.A. Glicósidos cardiotónicos y azúcares. En: *Métodos de Investigación Fitoquímica*. (ed). Dominguez, X.A. Editorial Limusa, pp. 195-209 (1973). México.
29. Dominguez, X.A. Biosíntesis de metabolitos secundarios de origen vegetal. En *Métodos de Investigación Fitoquímica*. (ed). Dominguez, X.A. Editorial Limusa, pp. 45-66. (1973). México.
30. Sanchez, O. Familia Burseraceae. En: *La Flora del Valle de México*. (ed). Sanchez, O. Editorial Herrero S.A. 6ta. edición. pp. 232-233 (1984). México.
31. Polakosky, K.L. Biochemistry of human seminal plasma. In: *Human Semen and Fertility regulation in Men*. Hafez, E.S.E. (ed). pp. 133-143 (1977) Sain Louis.
32. Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L. Biochemistry of human spermatozoa. *Biochemical Andrology*. pp. 167-173 (1975).
33. Hafez, E.S.E. The semen. In: *Human Reproduction*. Hafez, E.S. (ed) Harper & Row Pubs. (Ed). (1980). Hagerstown Maryland, U.S.A.
34. Zaneveld, L. The human eyaculate and its potential for fertility control. In: *Control of Male Fertility*. Scierra, J., Markland, C., Speidel J. (eds). pp. 41-53 (1975). University of Minnesota, U.S.A.

35. Huacuja, L., Delgado, N.M., Calzada, L., et al. Exchange of Lipids between spermatozoa and seminal plasma. In: Normal and Pathological Human Semen. Arch. Androl. 7:343-349, (1981).
36. Lindholmer, Ch. The importance of seminal plasma for human sperm motility. Biol. Reprod. 10: 533-543, (1974).
37. Huacuja, L. A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism. Life. Sci. 13: 1383-1394, (1973).
38. Overstreet, J.W. The importance of seminal plasma for sperm penetration of human cervical mucus. Fertil. Steril. 34: 569-573, (1980).
39. Lesson, T.S., Lesson, C.R. Aparato reproductor masculino. En: -- Histología. (eds). Lesson, T.S., Lesson, C.R. Editorial Interamericana. 4ta. edición. (1984). México.
40. Zaneveld, L. Proposed clinical nomenclature. Amer. Soc. of Andrology. March. pp. 13-16, (1979), Houston, Texas.
41. Hexitt, B.R. Spectrophotometric determination of total carbohydrate. Nature 182: 246-247, (1958).
42. Lane, S.R., Gilkerson, E. Quantitation of glycosaminoglycan hexosamine using 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazine hydrochloride. Anal. Biochem. 98: 478-480, (1979).
43. Bitter, t., Muir, H. A modified uronic acid, carbazole reaction. Anal Biochem. 4: 330-334, (1962).
44. Belsey, M.A. Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Concern, Singapore World Health Organization, Switzerland. pp. 11-12, (1980).

45. Fayrer-Hosken, R.A., Reynolds, D.C., Brackett, B.G. An efficient rabbit artificial vagina and its use in assessing sperm fertilizing ability in vitro. *Laboratory Animal Science*. 37: 359-361, (1987).
46. Toullet, F., Voisin, G.A. Spermatotoxic, spermagglutinating and cytotoxic activities of guinea-pig autoantibodies to sperm autoantigen T. *J. Reprod. Fertil.* 37: 299-313, (1974).
47. Abrunhosa, R. Microperfusion fixation of embryos for ultrastructural studies. *J. Ultrastruct. Res.* 41: 176-188, (1956).
48. Tso Wung-Wai. The spermicidal effect of gossypol. In: *Advances in Chinese Medicinal Materials Research*. Chabg, H.M., Yeung, - H.W., Tso, W.W. & Koo, A (eds). pp 647-660. *Vorl Scientific*. Singapore. (1985), Philadelphia.
49. Monte de Llano, O.B. Empirical Aztec Medicine, *Science*. 188: - 215-220 (1975).
50. Pozo del, E. Aztec pharmacology. *Ann Rev. Pharm.* 6:8-9, (1966).
51. San Agustín-Guerrero. There is a contraceptive in your backyard? *P.C.F. Media Service*, VIII (10), 1985.
52. Programa para la introducción y adaptación de la tecnología anticonceptiva (PIACT) de México, A.C. Vol. 2(4): 28, (1986). México.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
FACULTAD DE CIENCIAS

Expediente.....

Número ... 537/88 ...

SRITA. RITA GARCIA PLASCENCIA
P R E S E N T E . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de Tesis "EXTRACTOS ORGANICOS OBTENIDOS DE
Bursera fagaroides Y SU POSIBLE ACTIVIDAD ANTIFERTILIZANTE-
SOBRE LOS ESPERMATOZOIDES EYACULADOS DE HUMANO" para obte__
ner la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sid acep
tado como Director de dicha Tesis el M.en C. Juan Mora Ga__
lindo.

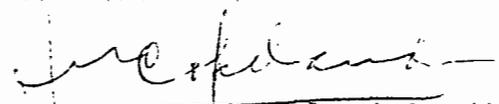


FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"AÑO ENRIQUE DIAZ DE LEON"
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Mayo 2 de 1988
El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario


Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El M.en C. Juan Mora Galindo, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

'mjsd

BOULEVARD A TLAQUEPAQUE Y CORREGIDORA. S.R.. TELEFONOS 19-80-54 Y 19-82-92

GUADALAJARA. JAL.

Guadalajara, Jal. Octubre 24 de 1988.

Dr. CARLOS ASTENGO OSUNA.
Director de la Facultad de Ciencias.
Universidad de Guadalajara.
P r e s e n t e :

Estimado doctor:

Por este medio comunico a usted que la Srita. Rita -
García Plascencia,, Pasante de la Licenciatura en Biología, con núme-
ro 080428685, ha concluido satisfactoriamente el trabajo de tesis --
titulada: EXTRACTOS ORGANICOS OBTENIDOS DE Bursera fagaroides Y SU __
POSIBLE ACTIVIDAD ANTIFERTILIZANTE SOBRE LOS ESPERMATOZOIDES EYACULA_
DOS DE HUMANO, realizado en la Unidad de Investigación Biomédica de -
Occidente del I.M.S.S.

Asimismo le informo que he revisado el manuscrito de
la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por -
la Facultad.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para en-
viarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e :



M. en C. JUAN MORA GALINDO.
Director de Tesis.