



**"INHIBICION DE LA FERTILIDAD EN LA RATA WISTAR MACHO  
CON EXTRACTOS DE PLANTAS: Kalanchoe gastonis bonnierii y  
Cotyledon wallichii DE LA FAMILIA CRASSULACEAE.**

Por

**MARIA DE LA LUZ MIRANDA BELTRAN**

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(ÁREA DE FISIOLÓGIA VEGETAL)**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS**

1998.



**"INHIBICIÓN DE LA FERTILIDAD EN LA RATA WISTAR MACHO CON  
EXTRACTOS DE PLANTAS: Kalanchoe gastonis bonnierii y Cotyledon  
wallichii DE LA FAMILIA CRASSULACEAE".**

Por

**MARÍA DE LA LUZ MIRANDA BELTRÁN**

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de

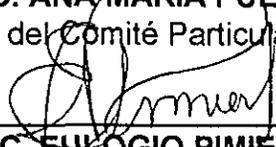
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(AREA DE FISIOLÓGÍA VEGETAL)**

**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS  
1998**

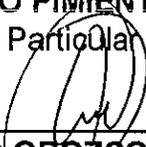
Aprobada por:

  
\_\_\_\_\_  
**M. en C. ANA MARÍA PUEBLA PÉREZ**  
Asesor del Comité Particular del estudiante

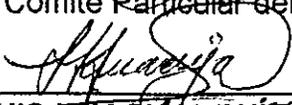
23/OCTUBRE/98  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. en C. EULOGIO PIMIENTA BARRIOS**  
Asesor del Comité Particular del estudiante

23-October 1988  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**M. en C. ARTURO OROZCO BAROCIO**  
Sinodal del Comité Particular del estudiante

23/oct/98  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**Dr. en C. LUIS HUACUJA RUIZ**  
Presidente del Comité Particular del estudiante

23/0ctubre/98  
Fecha

  
\_\_\_\_\_  
**M. en C. SANTIAGO SÁNCHEZ PRECIADO**  
Secretario Académico del CUCBA

23/Octubre/98  
Fecha



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**  
**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES**

**COORDINACION DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**M.V.Z JOSE RIZO AYALA**  
**SECRETARIO ADMINISTRATIVO**  
**DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE**  
**CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS**  
**DE LA U. DE G.**  
**P R E S E N T E**

**Con atención:**  
**Dr. MARCELINO VAZQUEZ GARCIA**  
**COORDINADOR DEL POSGRADO**

Por medio de la presente me permito informar que estoy de acuerdo en formar parte del comité particular de la estudiante **Ma de la Luz Miranda Beltrán** quien presenta la tesis de maestría "**INHIBICION DE LA FERTILIDAD EN LA RATA WISTAR MACHO CON EXTRACTOS DE Kalanchoe gastonis bonnierii y de cotyledon wallichii DE LA FAMILIA CRASSULACEAE**" del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad de Guadalajara.

Mi participación será como vocal en el examen de tesis.

Sin otro particular agradecemos su atención y aprovechamos para mandarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E**  
**“PIENSA Y TRABAJA”**

**Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., México, 30 de octubre de 1998**

**DR. EDUARDO RIOS JARA**



## Resumen

Extractos naturales crudos acuosos (ENCA) de algunas plantas de la familia Crassulaceae han sido utilizados como anticonceptivos vaginales por la población. Se Investigó el efecto inhibitorio de la fertilidad de Kalanchoe gastonis bonnierii (K. g. b.) y Cotyledon wallichii (C.w) en la rata wistar macho. Los (ENCAs) fueron obtenidos por presión mecánica de las hojas frescas de la planta, los extractos se clarificaron por centrifugación a 3000 rpm por 30 minutos, y se almacenaron en refrigeración hasta su uso. La toxicidad de los extractos fue previamente determinada antes de realizar el efecto inhibitorio. Dosis Subletales (150-300 mg/Kg de peso) de sólidos totales fueron administrados por vía oral diariamente a 15 ratas macho fértiles para investigar el efecto anticonceptivo, así como los cambios bioquímicos y fisiológicos sobre los espermatozoides y el líquido epididimario de la cauda. La adición de 20  $\mu$ l de los extractos (300  $\mu$ g de sólidos) a 20 millones de células producen 100 % de inmovilización-aglutinación. La LD<sub>50</sub> para K.g.b. fue de 11 mg/g de peso. El extracto de C.w. no produce letalidad con ninguna de las dosis empleadas. El efecto inhibitorio de la fertilidad fue de 50 - 100% después de la administración oral de los extractos durante 40 días, con un 100 % de recuperación 30 días después de suspender el tratamiento. La viabilidad, movilidad, densidad espermática y peso testicular fueron disminuidos significativamente por los tratamientos con el extracto natural de K.g.b. Los pesos de los epidídimos se observaron solamente disminuidos con el tratamiento de C.w. Los pesos corporales no fueron diferentes con respecto a los controles, El ácido siálico disminuyó significativamente solo con el tratamiento de K.g.b. Los cambios bioquímicos más importantes relacionados con la inhibición de la fertilidad, fue la menor concentración de la carnitina en el líquido epididimario inducida con los tratamientos de ambas plantas. Para producir 100 % de inhibición de la fertilidad, no solamente es importante la dosis, si no también la forma de la administración de los extractos. Los extractos de las plantas contienen al menos una sustancia con actividad significativa sobre el proceso de maduración de los espermatozoides del epidídimo.

## Abstract

Natural aqueous crude extracts (NACEs) of some Crassulaceae family plants have been applied as a vaginal contraceptives by the populace. The purpose of the present work was to evaluate the fertility inhibition effects of Kalanchoe gastonis bonnierii (K. g. b.) and Cotyledon wallichii (C.w) on wistar male rats, and some biochemical changes in spermatozoa and epididymal fluid. The (NACEs) were obtained by mechanic pressure on grinding fresh plant leaves, clarified by centrifugation at 3000 rpm for 30 minutes, and refrigeration until usage. The extracts toxicity were previously determined before the antifertility effect performed. Sublethal concentrations (150-300 mg/Kg weight) of total solid were orogastrically administered to 15 adult male fertile rats for searching the contraceptive effect as well as the physiology, and biochemical changes in the spermatozoa, and cauda epididymal fluid. The addition of 20  $\mu$ l of the extracts (300  $\mu$ g of solids) to 20 millions of sperm cells immediately produced 100% immobilization effects. The toxicity studies revealed that (K.g.b.) lethal doses ( $LD_{50}$ ) was 11 mg/g weight. C.w. extract did not produce lethality with any of assayed doses. The fertility inhibition was 50-100% after oral administration of the extracts during 40 days, with a later 100 % recovery 30 days after stopping the treatment. The sperm motility and viability as well spermatic density and testicular weight were significantly decreased by the treatments with K.g.b. natural extract. Epididymal weights were also decreased only with C.w. treatments. The body weights were no different to the control ones, sialic acid was significantly decreased only with K.g.b. treatments. The more interesting biochemical change related with fertility inhibition observed was the less carnitin concentration in cauda epididymal fluid induced by both plant treatments. For producing 100 % of fertility inhibition, it depends not only of doses administration, but how the treatments are performance. Both studied plants contain at less one substance with significant activity on epididymal spermatozoa maturation process.

## DEDICATORIAS

### **A mis padres:**

Con mucho cariño y amor. Hoy y siempre quiero agradecer el apoyo que siempre me han brindado. Por estar conmigo siempre en todo momento, y por darme el impulso de seguir adelante. Hoy y siempre mil gracias.

**Benjamín, Olivia y Beto:** Con mucho cariño y gracias por su comprensión y apoyo en todos esos momentos.

## AGRADECIMIENTOS

**A Dios.**

**Maestro Luis:**

Me es muy grato poder dedicar con mucho cariño esta tesis, agradecer hoy y siempre sus enseñanzas. Gracias por permitirme compartir con usted todos esos conocimientos, por siempre apoyarme en todo momento, corregirme con calma y paciencia y así aprender de mis errores. Por la motivación y ayuda que cada día me ofrece.

Gracias por ser hoy y siempre mi maestro...

**Ana:** De una manera muy especial agradezco hoy y siempre tus atenciones, tus consejos tan valiosos, así como también tus enseñanzas. Gracias por todo.

**A mis amigas: ( Gaby, Esther, Pepo, Isa, Martha, Isabel y Luisa)**

Por su amistad y por permitirme compartir no solo el trabajo sino también mis sueños e ilusiones.

**A todos mis compañeros**

Finalmente a mi **escuela y maestros** ya que sin ellos no hubiese sido posible la satisfacción del presente.

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN LA DIVISIÓN DE BIOLOGÍA DEL  
DESARROLLO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE  
OCCIDENTE DEL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**



# INDICE

BIBLIOTECA CENTRAL

## I.-INTRODUCCIÓN

### INFORMACIÓN BÁSICA DEL GAMETO MASCULINO

1.- Reproducción masculina .....	1
2.-Regulación hormonal del sistema reproductor masculino.....	1
3.-Regulación de la secreción del GnRH y gonadotrofinas.....	3
4.- La espermatogénesis.....	5
5.- Anatomía del tracto reproductor.. ..	8
6.- Maduración epididimaria.....	9
7.-Capacitación y reacción acrosomal.....	11

## II.- ASPECTOS HISTÓRICOS DE LAS PLANTAS

1.- La Etnobotánica y las plantas medicinales.....	14
--	----

## III.- ESTRATEGIAS EN ANTICONCEPCIÓN MASCULINA

### 1.- Anticoncepción con fármacos sintéticos

a.- Sulfasalazinas y Sulfonamidas.....	18
b.- Tamoxifén.....	19
c.- El etilen dimetan sulfonato.....	20
d.- Acetato de medroxiprogesterona/testosterona.....	20
e.- Enantato de testosterona y testosterona.....	23

### 2- Las plantas en reproducción

1.-Identificación taxonomica de las plantas.....	26
2.- Familia Crasulaceae.....	27
3.- Género <u>Kalanchoe</u> .....	27
4.- <u>Kalanchoe gastonis bonnierii</u> .....	28
5.- Género <u>cotyledon</u> .....	28
6.- <u>Cotyledon wallichii</u> .....	29

#### IV.- INHIBICION DE LA FERTILIDAD EN LA RATA MACHO CON EXTRACTOS DE PLANTAS Crasuláceas

1.- Planteamiento del problema.....	30
2.- Objetivo general.....	31
3.- Objetivos particulares.....	31
4.- Hipótesis.....	31
5.- Justificación.....	31
6.- Metas.....	32
7.- Programa de trabajo .....	33

#### V.- MATERIALES Y MÉTODOS

##### 1.- Estudios “in vitro”, primera etapa del trabajo

a.- Obtención de los extractos de <u>Kalanchoe gastonis bonnieri</u> y de <u>Cotyledon wallichii</u> .....	34
b.- Obtención y preparación de los espermatozoides.....	34
c.- Efectos fisiológico: movilidad espermática.....	36

##### 2.- Estudios “in vivo”, segunda etapa del trabajo

a.- Toxicidad de los extractos.....	36
b.- Inhibición de la fertilidad y reversibilidad del efecto con <u>Kalanchoe gastonis bonnieri</u> .....	36
c.- Actividad en la fisiología de los espermatozoides.....	37
d.- Cambios bioquímicos en los espermatozoides de la cauda y del líquido epididimario.....	38
e.- Inhibición de la fertilidad y reversibilidad del efecto con <u>Cotyledon wallichii</u> .....	39

#### VI.- RESULTADOS

a).- Estudios “in vitro”, primera etapa del trabajo.....	39
b).- Estudios “in vivo”, segunda etapa del trabajo. Toxicidad.....	41
c).- Efecto de los tratamientos sobre la fertilidad.....	41

d.- Cambios fisiológicos y bioquímicos en los espermatozoides.....	42
<b>VII.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>VIII.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>62</b>
<b>IX.- ESPECTATIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>X.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>64</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA I.-</b> Inhibición de la fertilidad en la rata macho wistar con el extracto crudo de <u>Kalanchoe gastonis bonnieri</u> .....	44
<b>TABLA II.-</b> Inhibición de la fertilidad en la rata macho wistar con el extracto crudo de <u>Cotyledon wallichii</u> .....	44
<b>TABLA III.-</b> Efecto de los extractos sobre la fisiología de los espermatozoides de la cauda del epidídimo después de los tratamientos.....	47
<b>TABLA IV.-</b> Efecto de los extractos sobre los pesos corporal y de órganos después de los tratamientos.....	48
<b>TABLA V.-</b> Composición bioquímica del líquido epididimario de animales tratados con los extractos y sin tratamiento (controles)..	49
<b>TABLA VI.-</b> Concentración lípida de los espermatozoides obtenidos de la cauda del epidídimo de animales tratados con los extractos y sin tratamiento (controles).....	50

CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL

## LISTA DE FIGURAS

FIG. 1.- Morfología general del espermatozoide de mamíferos.....	6
FIG. 2.- Diferentes estructuras moleculares con actividad anticonceptiva masculina.....	22
FIG. 3.- Fotografías de las plantas empleadas en el estudio. ....	35
FIG. 4.- Efecto inmovilizante y aglutinante de los extractos de <u>Kalanchoe gastonis bonnieri</u> y de <u>Cotyledon wallichii</u> . ....	40
Fig. 5.- Perfil de toxicidad del extracto natural de <u>Kalanchoe</u> <u>gastonis bonnieri</u> y <u>Cotyledon wallichii</u> .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS

**LH** Hormona luteinizante

**FSH** Hormona folículo estimulante

**GnRH** Hormona liberadora de gonadotrofinas

**ABP** Proteína unidora de andrógenos

**ENCA** Extracto natural crudo acuoso

**ECAs** Extractos crudos acuosos

**K.g.b.** Kalanchoe gastonis bonnierii

**C.w.** Cotyledon wallichii

**DL<sub>50</sub>** Dosis que mata el 50% de los animales en estudio

**LDL** Lipoproteína de baja densidad

**HDL - colesterol** Lipoproteína de alta densidad transportadora de Colesterol

**DHT** Dihidrotestosterona

## **I.- INTRODUCCIÓN**

### **INFORMACIÓN BÁSICA DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO**

#### **1. REPRODUCCIÓN MASCULINA**

El sistema reproductor masculino puede ser dividido en dos compartimientos: endócrino y canalicular, el primero incluye el cerebro, el hipotálamo, la glándula pituitaria anterior y los testículos responsables del desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias, así como la estimulación del desarrollo de la espermatogénesis. El compartimiento canalicular incluye los túbulos seminíferos y glándulas anexas que bajo la regulación del sistema endócrino produce y estimula la maduración de los espermatozoides. Los mecanismos reguladores de la interacción entre ambos compartimientos son extremadamente sensibles a cambios ambientales, consecuentemente, muchas sustancias son capaces de alterar este equilibrio.

El conocimiento de los eventos fisiológicos que regulan ambos compartimientos, nos permitirán entender los posibles mecanismos de la toxicidad de diferentes sustancias y por lo tanto desarrollar tratamientos adecuados para alterar o preservar la homeostasis del sistema reproductor (1).

#### **2. REGULACIÓN HORMONAL DEL SISTEMA REPRODUCTOR MASCULINO**

El testículo está regulado fundamentalmente por dos gonadotrofinas, hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), ambas son sintetizadas y liberadas en la hipófisis bajo la regulación del péptido hipotalámico hormona liberadora de las Gonadotrofinas (GnRH). El decapeptido GnRH es sintetizado en el hipotálamo y viaja hacia el interior de la glándula hipofisiaria por la circulación portal. El hipotálamo anatómicamente está unido a la hipófisis por los sistemas vascular portal y neural (2). El sistema portal vascular proporciona un mecanismo de salida del liberador

hormonal del cerebro a la hipófisis proporcionando la vía principal por la cual el cerebro controla la función anterior de la hipófisis. A través de un flujo inverso, la circulación portal hipofisiaria puede permitir también que las hormonas de la hipófisis arriben al cerebro por una vía más directa que a través de la circulación **(3)**.

En el hombre la LH y probablemente la FSH son liberadas en eventos episódicos con pulsos que ocurren aproximadamente cada 2 h. La liberación episódica de la LH ha sido claramente demostrada debido a que la vida media de la hormona circulante es de 1 h. En contraste, en el caso de la FSH, la liberación episódica es menos aparente, debido a que su vida media en la circulación es de 3 h. El grado y amplitud de la estimulación pulsátil de la GnRH altera los niveles plasmáticos de ambas hormonas LH y FSH y con ello, el estado de la función testicular.

La LH y FSH son glicoproteínas con pesos moleculares de 28,000 y 33,000 Da respectivamente y están compuestas de dos polipéptidos designados A y B. La subunidad A, común a ambas, pesa 14,000 y presenta 89 aminoácidos, cuya secuencia está bien conocida **(4)**. En la fracción B, la secuencia de aminoácidos muestra bastante similitud entre las distintas hormonas glicoproteicas y es posible que éstas resulten de la evolución de un mismo grupo precursor **(4)**. Las distintas características inmunológicas y funcionales de estas hormonas están determinadas por sus subunidades **(5)**. Ambas hormonas son secretadas por el mismo tipo de células basófilas en la hipófisis. La LH interactúa con receptores específicos de alta afinidad sobre las células de Leydig y con esto conduce al incremento en la síntesis de la testosterona **(6)**, la cual es necesaria para la espermatogénesis completa. La estimulación de la esteroidogénesis por la LH involucra la activación de la enzima intracelular adenilciclase y la proteína cinasa C **(7)**. En cuanto a la FSH, no se conoce totalmente su papel en la espermatogénesis. Sin embargo se ha demostrado que la acción de esta hormona requiere de la unión con receptores sobre la célula de Sertoli; esta unión induce el incremento de la

concentración de AMP - cíclico en las células de Sertoli, la activación de la proteína cinasa dependiente de AMP - cíclico y un incremento en la velocidad de síntesis de ARN y proteínas, incluyendo la síntesis de la proteína unidora de andrógenos (ABP) y el complejo de la enzima aromatasa que convierte la testosterona a estradiol **(8)**. Se piensa que la proteína unidora de andrógenos ayuda a mantener altas concentraciones de testosterona.

### 3. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DEL GnRH Y GONADOTROFINAS.

El grado de secreción de la LH es controlado por la acción de esteroides en el hipotálamo y la hipófisis. La testosterona y el estradiol pueden inhibir la secreción de LH. La testosterona puede ser aromatizada a estradiol en el hipotálamo y en la hipófisis, aunque, parece que estas hormonas actúan independientemente: la testosterona disminuye los niveles de la LH al reducir la frecuencia pulsátil, el estradiol disminuye los niveles de la LH al reducir la amplitud del pulso sin cambios en la frecuencia de este. La dihidrotestosterona también ejerce una retroalimentación negativa sobre la secreción de la LH, similar a aquella de la testosterona. La concentración sérica de FSH aumenta selectivamente en proporción a la pérdida de los elementos germinales en los testículos **(9)**.

El inhibidor no esteroide (inhibina) de los túbulos seminíferos parece que regula la secreción de la FSH. Sin embargo, estudios en rata castrada indican que las concentraciones de FSH y LH, pueden ser mantenidas crónicamente dentro de los rangos normales por testosterona sola, en ausencia de otros factores del testículo. Cuando la testosterona (T) está presente a concentración menor a la fisiológica con niveles fisiológicos de estradiol (E), este cambio en la relación T/E conduce a un incremento selectivo de la FSH con valores normales de LH **(10)**.

La testosterona normalmente está unida a  $\beta$ -globulinas (60%) y a la albúmina (35%); mientras que aproximadamente el 5% permanece libre. Esta

CUCBA



es la fracción libre que está disponible al tejido blanco. La  $\beta$ -globulina unidora de la testosterona es producida en el hígado, y su concentración es responsable de los valores normales de la testosterona y el estradiol. La testosterona y sus metabolitos son excretados principalmente en la orina (90%) en la forma de 17-cetoesteroides y una serie de compuestos polares, incluyendo diol y triol conjugados **(11)**.

El testículo es estimulado por las gonadotrofinas LH, FSH y la prolactina o lactotropina. Cuando es estimulado, el compartimiento intersticial, específicamente las células de Leydig producen testosterona, el primer esteroide endócrino. Dentro de los testículos la testosterona estimula los túbulos seminíferos y los órganos sexuales secundarios y la retroalimentación en el hipotálamo y cerebro para disminuir la liberación de gonadotrofinas **(12)**. Las células de Sertoli sintetizan productos endócrinos no esteroideos entre otros inhibina, activina, y la proteína fijadora de andrógeno (ABP). La acción específica de inhibina y activina sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonada es dependiente de la edad. La inhibina está involucrada en la regulación de la retroalimentación de la FSH y tiene efectos bien documentados sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gónada **(13)**. El uso del término inhibina es para referirse a un regulador específico en la retroalimentación para la secreción de la hormona folículo-estimulante. Dos formas de inhibina han sido aisladas del líquido folicular y son denominadas inhibina  $\alpha$  e inhibina  $\beta$ , ambas caracterizadas como dos hormonas diferentes de naturaleza glicoproteica y tienen diferentes subunidades llamadas  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente las que forman dímeros proteicos unidos por grupos disulfuro con la capacidad de suprimir la secreción de FSH. La inhibina  $\alpha$  es presentada como  $\alpha$ - $\beta$ -A y la inhibina  $\beta$  como  $\alpha$ - $\beta$ -B. Cada una de las subunidades es codificada por genes separados, los cuales producen productos de traslación representados como pro-proteínas las que son degradadas durante la síntesis de los dímeros para producir las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  considerablemente más pequeñas que las apo-proteínas **(14)**.

La complejidad de este campo para entender la función reguladora hormonal de las inhibinas, aumentó al demostrar que dímeros de la subunidad  $\beta$  denominados activina A ( $\beta$  A- $\beta$ B) y activina B ( $\beta$ B- $\beta$ B) y activina AB ( $\beta$ A- $\beta$ B) las que han sido aisladas de diferentes fuentes incluyendo el líquido folicular. Estas unidades díméricas tienen como función estimular la liberación de FSH de la hipófisis **(15)**. Consecuentemente, el proceso de dimerización entre las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , determina la naturaleza de los productos que emergen de una fuente que contiene RNAm para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y la acción biológica resultante sobre la secreción de la FSH por lo tanto puede ser variada considerablemente **(14)**.

El primer producto exócrino del testículo es la producción del espermatozoide **(Fig. 1)**, su función exócrina secundaria es la producción de secreciones que acompañan a los espermatozoides. Estas secreciones y aquellas de los órganos sexuales secundarios son requeridas para conducir a los espermatozoides dentro del tracto reproductor femenino para proporcionar el ambiente que le dará su funcionalidad y sobrevivencia **(16,17)**.

#### **4. LA ESPERMATOGÉNESIS**

La espermatogénesis es la diferenciación progresiva de las células germinales de la espermatogonia al espermatozoide maduro. Las observaciones del epitelio seminífero, tomando biopsias testiculares, revelan qué tipos de células específicas son vistas repetidamente en asociación con otras células. Estas agrupaciones celulares son conocidas como estados en el ciclo del epitelio seminífero. En el hombre hay seis estados de asociaciones celulares, cada uno representa un grado particular de maduración. Los estados I al VI constituyen un ciclo y ha sido estimado que en el hombre dura 4.6 ciclos o 74 días para que el espermatozoide maduro se derive de una espermatogonia **(18)**.

## MORFOLOGIA GENERAL DEL ESPERMATOZOIDE DE MAMIFEROS

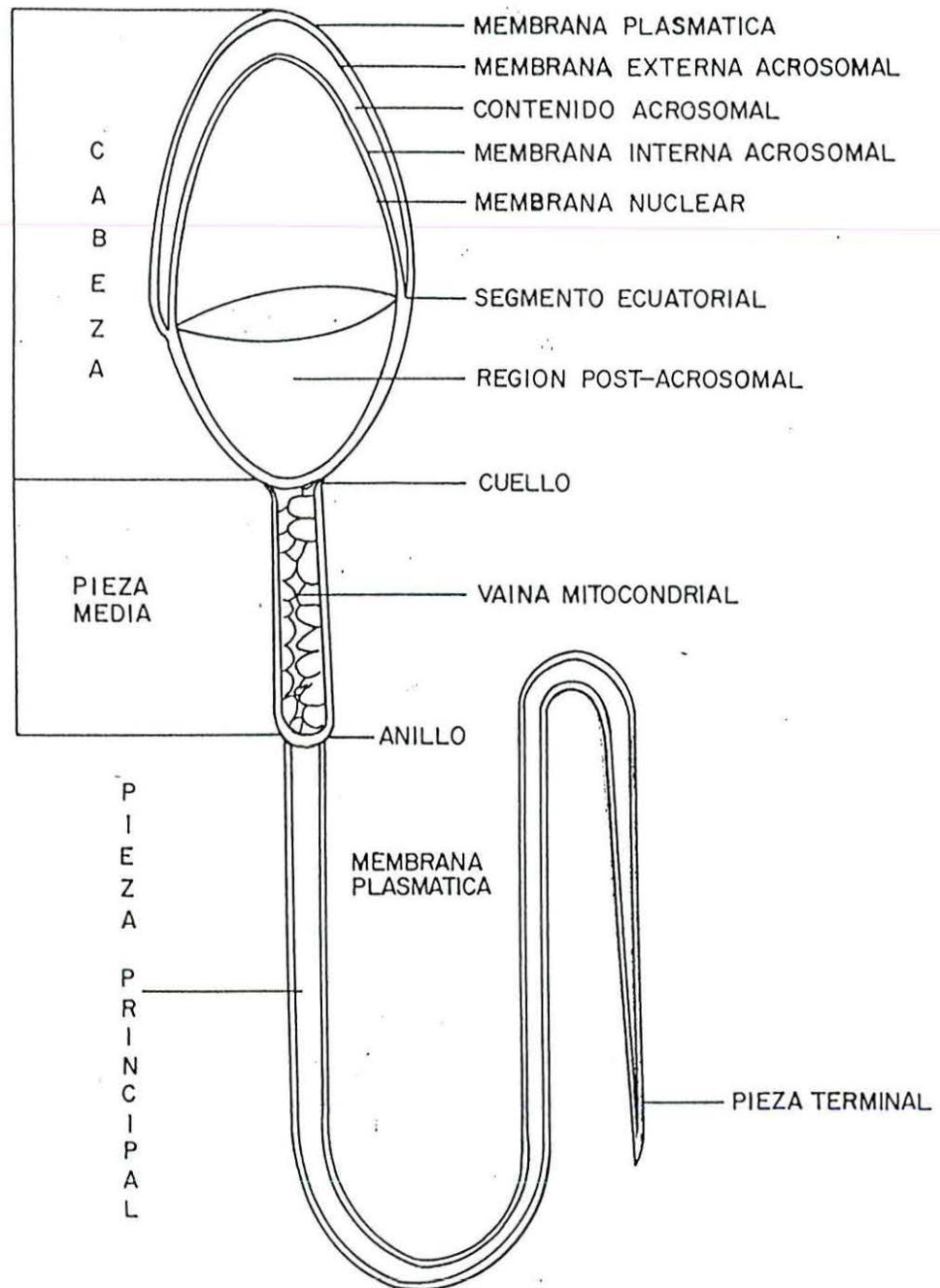


Fig. 1.- El espermatozoide morfológicamente está dividido en dos partes, la cabeza y la cola. La cabeza formada por el núcleo, cromatina condensada y la vesícula acrosomal y tiene una longitud aproximada de 5 a 6 micras de longitud y 3 micras de ancho. La cabeza se divide en dos regiones, acrosomal y post-acrosomal, la primera, cubierta por la membrana plasmática, membranas externa e interna del acrosoma y membrana nuclear. La cola o flagelo con longitud aproximada de 50 micras, está formada de 3 regiones: la pieza media que contiene las mitocondrias, la pieza principal y la pieza terminal que es un corto segmento y solo contiene microtúbulos del axonema y membrana plasmática.

Los rasgos ultraestructurales de la transformación de la espermatida al espermatozoide consiste en una reorganización altamente coordinada del núcleo con el citoplasma y el desarrollo del flagelo. La cromatina se vuelve progresivamente más densa y el núcleo adopta una posición excéntrica adyacente al polo craneal de la espermatida, separada de este por la capa acrosomal. La estructura ciliar que sirve como el centro o eje de la cola del espermatozoide se desarrolla de un centriolo cerca al aparato de Golgi que finalmente se constituirá en el axonema. Las mitocondrias forman una hélice rodeando a los cilios del cuello hasta el annulus de la cola. La región terminal de la cola consiste del filamento axial rodeado por la membrana plasmática.

La energía para la movilidad espermática es derivada de la hidrólisis del ATP generado en la cubierta mitocondrial. La estructura axial de la cola contiene un par central de microtúbulos rodeados por nueve dobletes de microtúbulos y nueve fibras densas externas. Los dobletes de microtúbulos están conectados en el par central por una serie de radios de naturaleza proteica que se continúan externamente con los brazos de dineína los que tienen actividad de ATPasa **(19)**. La movilidad es favorecida por el desplazamiento de los microtúbulos, el deslizamiento parece ser generado por la interacción de los brazos de dineína y es restringido por los brazos radiales que conectan con el par central de los microtúbulos **(20, 21)**. El espermatozoide eyaculado satisface su máximo requerimiento de energía mediante la utilización de la fructosa que proviene de las vesículas seminales, aunque puede también metabolizar anaeróbicamente la glucosa y la manosa hasta ácido láctico. Las mitocondrias de los espermatozoides tienen las enzimas de la vía glicolítica de Embden-Meyerhof y del ciclo de Krebs.

La espermatogénesis requiere de un eje hipotálamo-hipófisis intacto con un patrón normal secretorio de las dos hormonas gonadotróficas LH-FSH. La primera estimula la secreción de la testosterona de las células de Leydig en el testículo. La testosterona difunde del espacio intersticial al interior del túbulo

espermatogénico, donde esta afecta la espermatogénesis directamente o indirectamente a través de su efecto sobre la función de las células de Sertoli.

## 5. LA ANATOMÍA DEL TRACTO REPRODUCTOR

Los espermatozoides son liberados al lumen de los túbulos seminíferos con fluido secretado por las células de Sertoli. Los espermatozoides pasan a través de los conductillos eferentes, los cuales emergen del polo superior de cada testículo. Los conductillos drenan la secreción de los testículos y en este punto son conocidos usualmente como red de testis.

Después de su emergencia de la red de testis, los conductillos eferentes se juntan para formar el primer conducto mayor llamado conducto epididimario. Las paredes de los conductillos eferentes están formados por células mioideas que se contraen por sus propiedades intrínsecas sin embargo, este tejido contráctil se diferencia en músculo liso en el epidídimo y su actividad se incrementa bajo el control del sistema nervioso autónomo cuando el conducto desciende. El epitelio del conducto epididimario tiene un epitelio activo altamente ciliado. La densidad de los cilios disminuye progresivamente en la parte más distal del conducto. En su terminación cada conducto se engruesa considerablemente para formar el vaso deferente. Al entrar a la cavidad abdominal cada vaso deferente se une con su correspondiente vesícula seminal. En este punto cada vaso deferente se dilata para formar el ámpula del vaso. Las vesículas seminales reducen su diámetro en su parte más distal formando el conducto de la vesícula seminal, cada uno de estos conductos se unen con su correspondiente vaso deferente para formar el conducto eyaculador, éste penetra la glándula prostática entre los lóbulos laterales cubriéndose dentro de la uretra posterior.

La próstata es una estructura glandular que está incluida dentro de una cubierta o saco muscular. Está formada por tres lóbulos, uno mediano y dos laterales que rodean la uretra posterior. Las secreciones de la próstata que

son expelidas durante la eyaculación, salen de la glándula por una serie de pequeños conductos los que entran a la uretra prostática. Las glándulas vulvo uretrales son dos pequeñas glándulas lobuladas que secretan pequeñas cantidades de moco y se comunican con la uretra membranosa. Las glándulas uretrales también secretan cantidades pequeñas de moco y se abren dentro de la parte más distal de la uretra peneana.

## MADURACIÓN EPIDIDIMARIA

La actividad funcional del epidídimo y la maduración de los espermatozoides están íntimamente relacionadas, esta inter-relación es determinada en gran parte por los andrógenos testiculares que sirven para el mantenimiento de las células epiteliales en un estado diferenciado. Las principales modificaciones de los espermatozoides asociadas con su maduración se originan de un proceso dinámico en el cual los espermatozoides interactúan con el ambiente epididimario el cual a su vez contribuirá a las reorganizaciones moleculares las que participarán en el establecimiento y culminación de las características morfológicas como fisiológicas y bioquímicas del espermatozoide maduro; las que finalmente son el resultado del control hormonal de las células epiteliales del epidídimo sobre los espermatozoides.

Los cambios fisiológicos, morfológicos y bioquímicos que ocurren en los espermatozoides de mamíferos al transitar al conducto epididimario son conjuntamente denominados "maduración epididimaria del gameto masculino" (22). Los espermatozoides de la cauda del epidídimo son más fértiles que los espermatozoides del caput en el cobayo (23) esta observación ha sido confirmada en otras especies (24). Muchos investigadores coinciden en que los cambios en la matriz y fisiología del epidídimo son críticos para la maduración del espermatozoide. Durante el tránsito a través del epidídimo, los espermatozoides y su microambiente son sometidos a muchos cambios

dramáticos. Además de los cambios en la morfología química, movilidad, potencial fertilizante y metabolismo, los espermatozoides también sufren alteraciones en la permeabilidad, antigenicidad y cambios en la carga superficial, cambios que repercuten en la integración estructural y funcional de la membrana plasmática que favorece la expresión de moléculas o factores sobre el espermatozoide y que algunos están involucrados en la movilidad, metabolismo energético y en el reconocimiento y fijación a la zona pelúcida **(25)**.

El epidídimo depende de andrógenos para mantener su integridad histológica. La adquisición de la movilidad y el potencial fertilizante ocurre durante el tránsito epididimario. La secreción de carnitina, de glicerol fosforil colina (GPC) y ácido siálico al fluido epididimario es un proceso dependiente de andrógenos. El fluido luminal cambia significativamente en las diferentes regiones del epidídimo. Las concentraciones del inositol y proteínas totales disminuyen de la región del caput a la cauda del epidídimo **(26)**. En contraste la concentración del potasio aumenta. La gliceril fosforil colina, ácido siálico, carnitina, hipotaurina y acetil glucosamina son secretadas en grandes cantidades al fluido **(27)**.

Cambios morfológicos en los espermatozoides acontecen durante su maduración en el epidídimo a nivel de las membranas acrosomales, determinándose la curvatura del acrosoma y del área total de la cabeza como consecuencia de la compactación del núcleo y del contenido acrosomal **(26, 28)**.

La configuración molecular de la matriz acrosomal y cambios enzimáticos **(29)**, también ocurren durante la maduración como: aumento en el contenido de AMP-cíclico, pérdida de proteínas no nucleares, cambios en las concentraciones de aminoácidos libres, disminución de fosfolípidos y del ácido palmítico, incremento de la concentración de ácidos libres insaturados, cambios en las propiedades electroforéticas y estabilización de las desoxirribonucleoproteínas **(29)**.

**CUCBA**



## 7. CAPACITACIÓN Y REACCIÓN ACROSOMAL

La maduración epididimaria de los espermatozoides termina en la cauda del epidídimo, es decir, que los espermatozoides de este segmento del epidídimo ya han adquirido la habilidad fertilizante. Sin embargo, los espermatozoides recuperados del semen poco tiempo después de la eyaculación son incapaces de fertilizar al ovocito. Los espermatozoides antes de la fertilización, deberán someterse a una secuencia de eventos que incluyen cambios que en conjunto producen el fenómeno llamado capacitación tres eventos que están normalmente asociados con la capacitación son: la adquisición de una forma alterada de la movilidad llamada hiperactivación **(29)**, la habilidad de sufrir la reacción acrosomal y la capacidad de fijarse a la zona pelúcida de un ovocito no fertilizado. El tracto de la trompa parece ser la entidad anatómica con mayor efecto capacitante. Un factor descapacitante presente en el plasma seminal evita la capacitación prematura del espermatozoide **(30)**. Los espermatozoides de conejo capacitados se descapacitan y pierden su habilidad fertilizante cuando ellos son puestos en contacto con el plasma seminal o plasma epididimario. Cuando el plasma seminal es removido, este efecto inhibitorio es reversible y entonces el espermatozoide puede ser recapitado y nuevamente a adquirir su capacidad fertilizante.

El factor descapacitante del plasma seminal del conejo ha sido identificado como una glicoproteína termoestable con peso molecular de 350,000 daltones **(31)**. El papel del factor descapacitante en humano aún no ha sido aclarado, pero ha sido postulado que el tracto genital femenino destruye o por lo menos retira el factor descapacitante de la membrana del espermatozoide, probablemente sean proteínas que se comportan como ligandos naturales para retirar colesterol de los espermatozoides proporcionando mayor transporte a través de la membrana por un incremento en su permeabilidad **(31)**.

Esencialmente la capacitación espermática en todos los mamíferos, involucra una serie de cambios metabólicos y fisiológicos acompañados de un aumento

en la permeabilidad de la membrana plasmática **(32,33,34)**. Esta serie de cambios en forma natural son inducidos por la interacción con las secreciones del tracto reproductor femenino antes de que los espermatozoides puedan fertilizar **(35)**.

Cambios característicos en la movilidad del espermatozoide asociados tanto "in vitro" como "in vivo" con el estado final de la capacitación y el acontecimiento de la reacción acrosomal, han sido identificados en varias especies de mamíferos; estos cambios han sido referidos como "hiperactivación" **(36)**. La expresión más obvia de la hiperactivación es el movimiento más vigoroso de los espermatozoides pero con menor movilidad progresiva debido a:

- 1.- Incremento en el batimiento del flagelo
- 2.- Mayor amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza
- 3.- Debido a la trayectoria tortuosa e irregular del desplazamiento **(37 y 38)**.

La importancia funcional de la hiperactivación puede incluir la regulación del transporte del espermatozoide en el oviducto y la generación de la fuerza requerida para penetrar la capa de las células de la granulosa y la zona pelúcida **(36)**. La hiperactivación del espermatozoide capacitado de hamster está precedida por la elevación en la concentración intracelular de AMP cíclico y calcio con una significativa disminución del pH **(39)**.

La inducción y mantenimiento de la movilidad y la activación del metabolismo del espermatozoide durante la capacitación, están asociados con la activación enzimática: adenil ciclasa, protein-cinasas, ATPasas y fosfolipasas A2. Está previamente demostrado que la actividad de la adenilato ciclasa del espermatozoide aumenta durante la capacitación, elevando las concentraciones intracelulares del AMP-cíclico **(36, 40)**. Estos cambios no solamente favorecen la vigorosidad de la movilidad, también estimulan la actividad de las proteínas cinasas dependientes de AMP- cíclico para inducir cambios en las propiedades fisiológicas de las membranas de los espermatozoides **(41, 42)**.

En conjunto, los cambios más importantes que se conocen y participan en la capacitación "in vitro" son:

- A)** Eliminación o modificación de materiales adsorbidos durante la maduración y/o al ponerse en contacto la superficie de los espermatozoides con los componentes del plasma seminal **(43,44)**;
- B)** Disminución de la carga neta superficial aparentemente debido a la pérdida del ácido siálico y de algunos compuestos sulfatados como el colesterol sulfato **(45)**;
- C)** Cambios en glicoconjugados y su distribución sobre la superficie del espermatozoide **(46)**;
- D)** Modificación en la distribución y contenido de antígenos de superficie **(36, 47)**;
- E)** Cambios en el patrón de distribución de partículas intramembranas **(48,36,43)**;
- F)** Modificaciones en las conformaciones intrínsecas de proteínas de la membrana **(49)**;
- G)** Cambios en la permeabilidad membranal a iones, principalmente al calcio **(41)** y **H)** incremento de la movilidad progresiva, consumo de oxígeno y utilización selectiva de fosfolípidos endógenos al inducir la salida de zinc del espermatozoide humano **(50,51)**.

Una de las principales consecuencias de la capacitación parece ser la desestabilización de la membrana debido en parte a la pérdida de colesterol propiciando la entrada de calcio, que a concentraciones micromolares activa la fosfolipasa A<sub>2</sub> produciendo de esta manera lisolecitinas más ácidos grasos libres con actividad fusiogénica entre las membranas plasmática y acrosomal externa para favorecer la fenestración de las membranas y consecuentemente la reacción acrosomal **(52,53, 54)**.

Estos eventos conducirán en los espermatozoides a la liberación de varias enzimas necesarias para el proceso de la fertilización. Los espermatozoides

deben penetrar el cúmulus, la corona radiada a la zona pelúcida del ovocito para interaccionar y fusionarse con la membrana plasmática **(33)**.

## **II.- ASPECTOS HISTÓRICOS DE LAS PLANTAS**

### **1.- La etnobotánica y las plantas medicinales**

La Etnobotánica es el estudio científico de las interrelaciones que se establecen entre grupos culturales o etnias y el medio vegetal a través del tiempo y en diferentes ambientes climáticos. La especificidad de estas interrelaciones radica en un doble proceso: **a)** Por una parte, las propiedades fisiológicas y genéticas de las plantas y de la estructura del ecosistema y del medio geográfico en que estén insertas determinan la evolución biológica de la flora y la historia de los cultivos. **b)** Por la otra parte, toda formación cultural genera un estilo étnico característico, que determina la transformación de su medio ambiente; este estilo étnico surge por una estrecha relación en la constitución general del medio ambiente, por las determinaciones que impone este a la conformación de una estructura social, lenguaje, desarrollo técnico, sensibilidad, división del trabajo y organización productiva **(55)**.

Todos los pueblos primitivos han adquirido información sobre las propiedades medicinales de gran número de plantas propias de su medio ambiente. Estos conocimientos se han transmitido primero verbalmente de generación en generación y después en forma escrita en tablas de barro cocido, pergaminos, farmacopeas y otros tratados. El primer estudio cuidadoso de las plantas fue realizado por quienes practicaban la medicina herbolaria, prueba de ello lo constituye el papiro de Ebers, escrito hace 3500 años el cual contiene una lista de plantas medicinales y se precisa el uso de ellas **(56)**. En el año 372 a C. Teofrasto, discípulo de Aristóteles escribió 10 libros sobre la historia de las plantas. En el año 77 a C. Discórides escribió su libro de "Materia médica", en la que menciona todas las plantas medicinales conocidas por los griegos.

Galeno escribió 20 libros sobre medicina y farmacia, con ello se inicia la formalización del empleo de las plantas medicinales ( 56).

Los conocimientos sobre las plantas medicinales de América fueron transmitidos por los aborígenes, misioneros y viajeros españoles. En México, los primeros libros de la botánica aplicada a la medicina fueron elaborados durante la época colonial, esta manera de consignar el conocimiento botánico se introdujo al país, como parte de la influencia cultural que la medicina europea tuvo en el estudio de la naturaleza. Requisito de estas obras, era estar ilustradas con dibujos y acompañadas de comentarios útiles sobre la aplicación de las plantas curativas.

De todo el período colonial solo se conocen actualmente 4 libros que cumplieron en diferentes formas, con estas características: **“El libelus de medicinalibus indorum herbis”**, 1552, obra de Martín de la Cruz y Juan Badiano; **“Historia Natural de la Nueva España”** escrita entre 1571 y 1577 por Francisco Hernández; **“El libro XI de la Historia general de las cosas de la Nueva España”** escrito por Fray Bernardino de Sahagún entre 1560 y 1590 y **“El jardín Americano,”** fechado en 1801, manuscrito elaborado por el Fraile Francisco Juan Navarro (57).

El rey Felipe II de España y de las Indias designó a Francisco Hernández figura destacada en el medio intelectual de la época “Protomédico General de las Indias, Islas y Tierra firme del mar oceánico” a quién le encomendó emprendiera la exploración detallada de la riqueza natural de la Nueva España. Hernández recorrió la Nueva España durante 7 años (1571- 1577) realizando una labor de investigación, recolección y clasificación de plantas y animales que todavía hoy resulta sorprendente. Recorrió la Nueva España, y una amplia extensión de la hoy República Mexicana. Trataba de formar un inventario preciso de los recursos vegetales con que contaba la colonia, sus ventajas y desventajas, pero sobre todo se pretendía valorar sus propiedades alimenticias, medicinales y comercio en general, a fin de corroborar la información hasta entonces conocida.

Hernández no se encontró con un territorio poblado por gente primitiva, recorrió naciones conquistadas cuyos habitantes habían alcanzado un alto grado de desarrollo cultural y en donde la utilización de los recursos naturales se hallaba íntimamente ligada a la vida económica, religiosa y social.

La visión que tenía Hernández de ese mundo indígena de las costumbres y conocimientos de los indios era la del representante de una cultura que había vencido al “primitivo” pueblo aborígen ajeno a la civilización cristiana y a su medicina era la suya, la visión de la cultura dominante (57).

La herbolaria tal y como la usaba la medicina indígena, fue desechada por la autoridad virreinal por razones adjudicadas a la idolatría y sus conocimientos culturales más que por su ineficacia. El análisis crítico que el protomédico Fray Francisco Hernández hizo de la medicina indígena, reveló que en el México colonizado, y durante varios siglos, la inmensa mayoría de los habitantes sobrevivieron con su cultura médica y no con la de los españoles, cuyo radio de influencia siempre fue menor. La medicina española incorporó las maravillosas plantas americanas a sus textos, recetas y prácticas médicas siguiendo las directrices de Hernández. La extensa obra escrita por Hernández no tuvo la suerte de ser leída en la Europa de su tiempo; a pesar de las copias que realizó de su manuscrito, éste no pudo ser publicado.

En 1889 se creó en México el Instituto Médico Nacional, el cual trabajó hasta 1915 sobre las plantas medicinales utilizadas tradicionalmente por los indígenas. La farmacopea mexicana, también menciona mucho de los resultados obtenidos en el Instituto Médico Nacional por Maximino Martínez, en el libro “plantas medicinales de México” el cual contiene más de 900 plantas mexicanas con su descripción botánica, utilidad e información química sobre ellas (58).

Actualmente la fitoterapia se practica en casi todo el mundo en forma de medicina indígena, tradicional o científica. **La medicina indígena** es de uso empírico, se practica en países de África y de América del sur, se basa en la creencia de que una planta es capaz de curar un determinado órgano si

presenta alguna semejanza con este **(59)**. **La medicina tradicional** se practica ampliamente en países como China, India, Japón y Vietnam, entre otros, en los que se emplea directamente el té medicinal de polvos preparados. **La medicina científica** tiene un uso modesto, pero sin embargo se utiliza en países como Inglaterra, Italia, Alemania, Estados Unidos, entre otros. Las plantas se utilizan para obtener principios activos para ser usados directamente o aprovecharlos para la síntesis de otras sustancias. Independientemente del tipo de medicina que utilicen los diferentes pueblos para resolver sus problemas de salud. Igualmente importante ha sido el hecho de cómo regular el número de miembros de la familia debido al crecimiento de la población mundial tan acentuado ya que cada día resulta más difícil la obtención de satisfactores para una vida de calidad. En este contexto la investigación en Biología de la Reproducción es una área básica de interés para conocer más acerca de la biología molecular de los gametos, su fisiología y los mecanismos que participan en el proceso reproductivo y por ende en la regulación de la fertilidad humana.

En este sentido, la investigación multidisciplinaria propició el desarrollo de diferentes métodos anticonceptivos como la práctica del ritmo **(60)**, la interrupción del coito **(61)**, anticoncepción a nivel vaginal **(62, 63)** o intrauterina utilizando dispositivos inertes o bioactivos **(64,65)** empleo de hormonas por vía oral o inyectadas **(66, 67)** o bien métodos quirúrgicos permanentes **(68,69)**.

Se ha demostrado que los diferentes procedimientos anticonceptivos producen efectos muchas veces graves tanto para la mujer, como para el niño, en caso de resultar embarazada utilizando anticonceptivos. Los anticonceptivos orales o inyectados pueden provocar daños en términos de gestación ectópica, malformaciones congénitas, mortinatos y abortos mientras que los dispositivos intrauterinos provocan principalmente abortos, alteración en la proporción de sexos y bajo peso al nacer **(70)**. Los espermicidas

vaginales pueden ocasionar malformaciones congénitas, aunque parecen tener efectos apreciables solamente en el riesgo de abortos espontáneos **(62, 63)**. No obstante a las diferentes alternativas para controlar la fertilidad, actualmente no existe un método que ofrezca: seguridad, eficiencia, reversibilidad, confiabilidad, efectos colaterales indeseables mínimos y de bajo costo. La anticoncepción masculina no se ha desarrollado tanto como la femenina y debido a ello, es que nuestros conocimientos básicos sobre la regulación de la fertilidad masculina son aún muy limitados comparados con los de la fertilidad femenina. Sin embargo, se proponen varios sitios adecuados que podrían ser utilizados para la **anticoncepción masculina**.

### **III.-ESTRATEGIAS EN ANTICONCEPCIÓN MASCULINA**

#### **1.- Anticoncepción con fármacos sintéticos**

##### **a.- Sulfasalazinas y sulfonamidas**

La interferencia con la maduración epididimaria del espermatozoide es una alternativa viable, no afecta la libido, la espermatogénesis, ni la integridad del genoma del espermatozoide. Al respecto, diferentes grupos han demostrado que el epidídimo es muy sensible a diferentes fármacos como: las sulfasalazinas y **(71,72)**, sus derivados sulfonamidas **(73)**, empleando concentraciones entre 300 a 500 mg/Kg administrados por vía oral durante 45 a 60 días se produce infertilidad reversible **(fig. 2)**.

Estas sustancias son absorbidas por el epitelio epididimario, se acumulan en el líquido epididimario en concentraciones significativamente mayores con respecto al suero sanguíneo ( $192 \pm 17.1$ ,  $96.7 \pm 11.7 \mu\text{g/ml}$ ) ( $72.9 \pm 7.6$ ,  $16.8 \pm 1.3 \mu\text{g/ml}$ ) respectivamente **(73)**. Estos compuestos afectan significativamente el número de hembras embarazadas, así como el número y tamaño de embriones resultantes y la contractilidad del epidídimo "in vitro" **(73,74)**. Después del acceso al compartimiento epididimario, las drogas podrían unirse a las membranas de los espermatozoides y afectar la capacitación, la reacción

acrosomal y cualquier otro evento pos-testicular que es esencial para una exitosa penetración del ovocito (73). Con estos tratamientos, los espermatozoides exhibieron importantes cambios morfológicos: alteraciones en la superficie de la cabeza, con abundantes precipitaciones dándole un aspecto rugoso, separación de la cola y algunos espermatozoides con movilidad lenta y sin progresión (75). Estas anomalías son consecuencia del efecto tóxico de las sulfasalazinas sobre los espermatozoides del caput y cauda del epidídimo. La anticoncepción masculina con sulfasalazinas y sus análogos, no parece ser buena opción ya que para producir la infertilidad experimentalmente, se emplean dosis diarias muy altas 12 veces mayor a las empleadas clínicamente, lo cual posiblemente produzca algunos efectos indeseables.

#### **b.-Tamoxifén**

El tamoxifén, otro compuesto no esteroide derivado del estilbeno en humano y en ratas es predominantemente antiestrogénico, a dosis diarias de 200 y 400 ug redujo las concentraciones de LH y testosterona en el plasma, reduce el peso de los testículos, de los epidídimos y el de los órganos sexuales secundarios. El testículo de las ratas tratadas con tamoxifén (400 µg/Kg/día) mostró una marcada desorganización de las células germinales de los túbulos seminíferos. Se redujo el número de sitios de implante, el índice de fertilidad, el número de productos (76). La concentración de testosterona en el plasma fue menor que en los controles, sin cambios en las concentraciones de LH y FSH, prolactina y estradiol. La organización de las células germinales y su asociación celular representa la citoarquitectura adecuada para que la dinámica del ciclo celular de los túbulos seminíferos suceda correctamente. Es posible que la desorganización observada de la citoarquitectura del túbulo seminífero y daño a la espermatogénesis pudo deberse a la alteración de las células de Sertoli. Debido a que las concentraciones de LH y FSH en el plasma sanguíneo no se modificaron por los tratamientos con el tamoxifén, es

posible que su acción sea sobre los receptores de la LH en las células de Leydig afectando la adecuada estimulación para la producción de testosterona. De manera similar sucedería con los receptores de FSH en las células de Sertoli afectándose su fisiología y con ello las interacciones adecuadas con los espermatocitos y con la espermiación. Los cambios inducidos por el tamoxifén fueron completamente reversibles al suspender el tratamiento con la normalización del peso de las glándulas sexuales, las concentraciones circulantes de testosterona y LH (**Fig 2**), (76).

**c.- El etilen dimetan sulfonato** es un compuesto derivado de la serie alcanosulfonatos el cual produce infertilidad después de la administración por vía intraperitoneal con dosis única de 100 mg/Kg a los 21 días del tratamiento se observó destrucción de las células de Leydig, disminución de espermatozoides tanto en el testículo como en el epidídimo así como marcada disminución en los pesos de las vesículas seminales, testículos y epidídimos. Parece que una causa inicial de la infertilidad es la supresión del soporte androgénico al epidídimo con posible absorción de espermatozoides seguidos por una degeneración del epitelio seminífero. Más aún, la secreción de la proteína unidora de andrógenos (ABP) por las células de Sertoli que es dependiente de andrógenos, fue significativamente menor en el epidídimo después del segundo día del tratamiento, afectándose de manera importante la diferenciación de la célula germinal en el proceso de la espermatogénesis (**Fig. 2**), (77).

#### **d.- Acetato de medroxiprogesterona/testosterona**

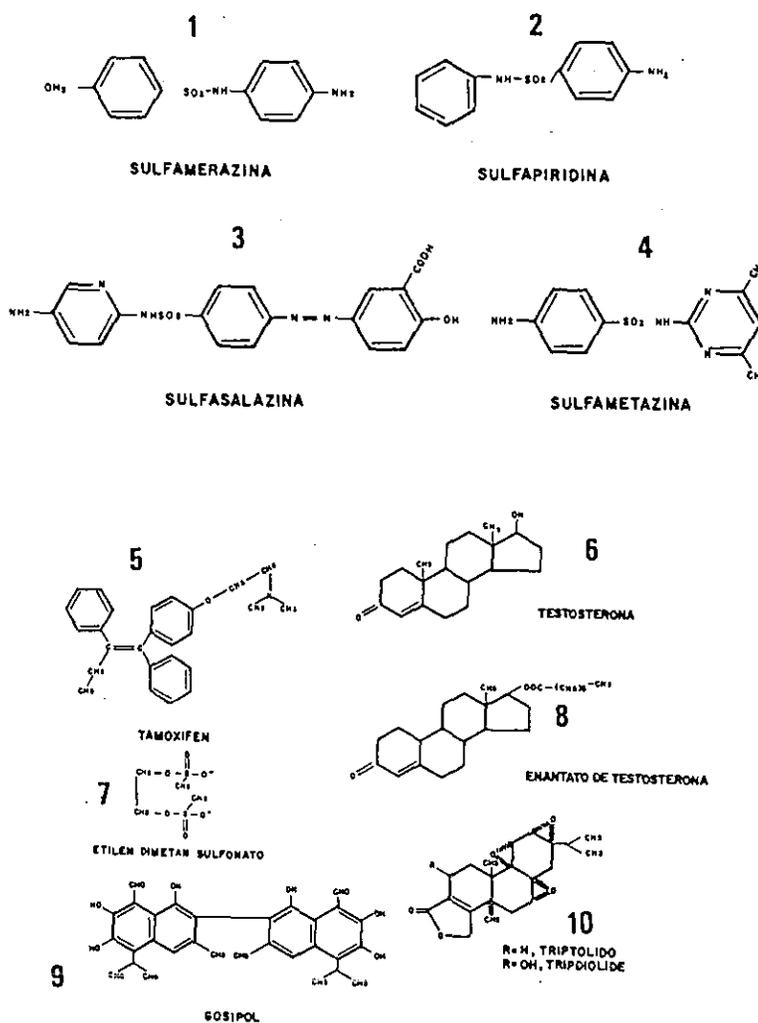
Actualmente la novedad en materia de anticoncepción masculina se centra en la manipulación de las hormonas que interrumpen la producción de espermatozoides. Desde un planteamiento endócrino, el efecto anticonceptivo lo constituiría una inyección intramuscular de la testosterona u hormonas masculinas semejantes que indujeran la liberación de la hormona al torrente

sanguíneo. Esta estrategia apoyada fuertemente por la Organización Mundial de la Salud se basa en el comportamiento de andrógenos en concentraciones circulantes no usuales, que ordenan al cerebro disminuir la secreción de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) y consecuentemente la secreción y liberación de la LH y de la folículo estimulante (FSH) afectando directamente a las células blanco (de Leydig y de Sertoli) respectivamente, para la síntesis de testosterona y de proteínas entre otras como la fijadora y acarreadora de andrógenos (ABP) **(78)**.

El tratamiento combinado con acetato de medroxiprogesterona y testosterona, a partir del tercer mes de tratamiento, produce oligospermia aguda (tres millones de espermatozoides por ml ) sin afectar la movilidad ni los niveles de testosterona circulante. Aumenta 4 veces la DHT y en la misma proporción disminuyen los valores de LH y FSH **(79)**. Se propone que la disminución de estas hormonas probablemente se deba a la desaparición de la secreción pulsátil de las gonadotrofinas. El mantenimiento de las concentraciones de testosterona en el plasma fue, debido indudablemente a la ruta percutánea administrada, la cual permitió el almacenamiento de la testosterona en el tejido subcutáneo con la subsecuente liberación prolongada y eliminación más gradual. La reducción en la concentración de la L-carnitina durante el tratamiento podría ser el reflejo selectivo de la medroxiprogesterona sobre el epidídimo, aunque parece más factible un efecto indirecto con la disminución del número de espermatozoides del epidídimo. Posibles efectos colaterales con el tratamiento combinado podría suceder debido al uso metabólico anormal de la glucosa que ha sido observado. Este procedimiento combinado podría ser indicado solo bajo una estricta vigilancia y siempre en absoluto consentimiento de la pareja y vigilar la oligospermia aguda inducida ( $1 \times 10^6$  ml) verificada regularmente durante el tratamiento **(Fig. 2)**.

## DIFERENTES ESTRUCTURAS CON ACTIVIDAD ANTICONCEPTIVA MASCULINA

### A



### B

Fig. 2.- Diferentes estructuras moleculares con actividad anticonceptiva masculina. A.- Sustancias del grupo de las sulfasalazinas (1, 2, 3 y 4) producen infertilidad en forma reversible, pero no se conocen efectos colaterales. B.- Diferentes categorías de estructuras moleculares que producen infertilidad con tratamientos y tiempo de recuperación muy largos (6, 8 y 9). Con dosis muy bajas produce infertilidad, no se conocen efectos colaterales (5). No produce efectos adversos y es altamente específico para anticoncepción masculina (10).

### e.- Enantato de testosterona y testosterona

Cuando se administra enantato de testosterona o testosterona sola por vía intramuscular (200 mg/semana) se produce oligospermia ( $3 \times 10^6$  células/ml) que puede llegar a la azoospermia. Si no se obtiene la oligospermia deseada de manera consistente después de seis meses de tratamiento éste debe suspenderse. Durante los tratamientos se observó un incremento en el peso corporal, hemoglobina, creatinina, urea, testosterona, estradiol y disminución en el tamaño testicular y frecuentemente casos de azoospermia irreversible, así como un incremento progresivo de los triglicéridos, produce acné y alteración del carácter acompañado durante el tratamiento y la recuperación **(79, 80)**. Los valores de las lipoproteínas HDL-colesterol y LDL disminuyeron significativamente, observándose en consecuencia una disminución en la relación HDL-colesterol/LDL; lo que coincide con los hallazgos de otros estudios **(81,82)**. Las variaciones observadas se normalizaron después de seis meses de interrumpidos los tratamientos. Sin embargo, no se descarta el riesgo de que la disminución de las lipoproteínas potencialmente podría generar padecimientos cardíacos **(fig. 2)**

### 2.- Las plantas en Reproducción

La anticoncepción masculina también se ha intentado con sustancias no hormonales de origen vegetal, en algunos casos con buenos resultados y con mínimos efectos colaterales. Mediante estudios "in vitro" se ha demostrado que la adición de 80  $\mu\text{g}$  a espermatozoides de humano de Phytolacca dodecandra y 500  $\mu\text{g}$  de Phytolacca americana y Caléndula officinalis, saponinas crudas obtenidas de Phytolacca dodecandra, Phytolacca americana y Caléndula officinalis produce en 100 % de inmovilización en tiempo de 3 a 15 min. **(83)**. Hibiscus rosa sinensis afecta la espermatogénesis en rata con un efecto variable que depende de la época del año en que se recolecta **(84)**.

Arum maculata y Arum orientale de las que se utiliza la raíz, se ha visto que el extracto funciona específicamente con la región caudal de los espermatozoides.

Estudios realizados en la India con fracciones (acetato de etilo) de Mollugo pentaphylla (hierba tropical) muestra que esta contiene una saponina (mollugogenol A) que con 300 ug/ml presenta un efecto espermicida, aumenta la peroxidación de lípidos incrementando la actividad de la superóxido dismutasa. Los espermatozoides tratados con el extracto y observados con el microscopio electrónico mostraron cambios significativos en la membranas, cabeza, cola, y con hinchamiento y rotura de la membrana acrosomal (85). En otro estudio se probaron cerca de 200 extractos de plantas con posible actividad biológica con espermatozoides de la cauda del epidídimo de rata. De estos, 16 extractos presentaron actividad espermicida, entre los que destacan los obtenidos de Acacia decurrens, Bursera serrata, Tsuga dumosa. La actividad espermicida fue asociada a *amurin* que es un tipo de saponina y la actividad de coagulación debido a la presencia de taninos (86).

Se ha reportado que extractos de plantas contienen alcaloides algunos de estos afectan el metabolismo de los espermatozoides y su movilidad, como la cloroquina, emetina, quinina y quinacrina. Se ha establecido que estas drogas tienen múltiples efectos inhibitorios de las enzimas que participan en la respiración y la fosforilación (87).

Una reciente comunicación china refiere efectos del gospol: impide la producción del espermatozoide, inmoviliza los espermatozoides, destruye enzimas de la zona acrosomal, variando su efecto dependiendo de la dosis (88). En el hombre produce infertilidad, pero con tratamientos y tiempos de recuperación muy prolongados acompañados de evidentes efectos indeseables, produce fatiga muscular con algunos episodios de parálisis y con daño muy severo a nivel testicular (89). Tripterigium wilfordii (Tw) es una planta que se había utilizado principalmente en lesiones de piel y además posee efectos inmunosupresor y antitumoral, produce destrucción de los

espermatozoides a nivel epididimario con mínimos efectos a nivel testicular. No altera el peso corporal ni las concentraciones de iones sodio, potasio, y de la hormona folículo-estimulante (FSH), en el suero sanguíneo (90) y se reporta que la destrucción de los espermatozoides es producida por glicósidos. Además de esta planta, se han aislado otros compuestos como: alcaloides y terpenoides (91). La actividad anticonceptiva de (T.w.) resultó específica para el sexo masculino, por lo que actualmente se está trabajando a nivel clínico para regular la fertilidad masculina en forma reversible (92). De esta planta a partir de preparados ricos en glicósidos ha sido posible aislar, purificar y caracterizar la estructura molecular que produce el efecto antifertilizante descrito (93). Esta capacidad de interferir con la fertilidad masculina tal vez pudiera lograrse con otros glicósidos complejos recientemente reportados con actividad antimicrobiana, antitumoral, antiparasitaria y con actividad inmunopotenciadora (94).

En la medicina tradicional mexicana se reporta la inhibición de embarazos mediante la utilización a nivel vaginal de extractos crudos acuosos de algunas plantas de la familia Crassulaceae. Recientemente mediante estudios "in vitro" se ha demostrado potente efecto inmovilizante y aglutinante de los espermatozoides de diferentes mamíferos, incluyendo a los del humano con el extracto crudo de Echeveria gibbiflora, sin afectar la viabilidad y la actividad respiratoria (95). Este doble efecto también lo produce el extracto hidroalcohólico de Sedum oxipetalum y el extracto natural acuoso de Kalanchoe flammea, Kalanchoe blossfeldiana de las cuales se ha logrado separar el principio activo con alto grado de pureza (96,97).

Teniendo en consideración nuestras experiencias previas con extractos crudos acuosos de algunas Crasuláceas, se ha considerado conveniente continuar el estudio del efecto antifertilizante en forma reversible con extractos de Kalanchoe gastonis bonnierii y de Cotyledon wallichii, usando como material biológico de ensayo la rata macho wistar.

**IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS PLANTAS INVOLUCRADAS EN EL ESTUDIO.**

**CLASIFICACIÓN DE Kalanchoe gastonis bonnieri (98)**

**DIVISIÓN:** Angiospermas

**CLASE:** Dicotiledóneas

**SUBCLASE:** Arquiclamídeas

**ORDEN:** Rosales

**FAMILIA:** Crassulaceae

**GÉNERO:** Kalanchoe

**ESPECIE:** gastonis bonnieri

**CLASIFICACIÓN DE Cotyledon wallichii (98)**

**DIVISIÓN:** Angiospermas

**CLASE:** Dicotiledoneas

**SUBCLASE:** Arquiclamídeas

**ORDEN:** Rosales

**FAMILIA:** Crassulaceae

**GÉNERO:** Cotyledon

**ESPECIE:** wallichii

**NOMBRE COMÚN:** cuerno de venado

## **FAMILIA CRASSULACEAE**

Es una familia originaria del África sur-occidental, contiene un gran número de especies, ampliamente encontradas, son plantas anuales que, comprenden numerosos géneros, ricos en especies de características muy diversas. Las hojas son suculentas, revestidas de cera o pelos y las flores estrelladas, formando rosetones o inflorescencias, reunidos en espigas al final de los tallos, que son bastante largos **(99)**. Esta familia de suculentas, son plantas que tienen tejidos que almacenan agua. Estas plantas son nativas de climas áridos, y de húmedos a lluviosos durante una época, dependiendo de las estaciones del año. Los miembros de esta familia tienden a crecer mejor en tierras mediodrenadas que son porosas, pero que también contienen algunos materiales pesados para mantener el agua. Estas plantas crecen con la luz solar total, aún cuando sobreviven en períodos bajos de luz. En la estación de crecimiento estas plantas suculentas requieren de humedad, pero también tienen estaciones latentes o semilatables en el cual no crecen, pero se encuentran en estado de reposo, durante este tiempo las plantas solo toman pequeñas cantidades de agua para evitar causar daño a su raíz. La mayoría de estas plantas podrían ser fertilizadas durante su estación activa, pero la mayoría tiende a crecer lentamente. Las plantas se propagan fácilmente de el tallo o de las hojas**(100,101)**.

### **Género Kalanchoe**

A este género pertenecen unas 200 especies casi todas originarias del África tropical, África Meridional, Madagascar, India, Formosa, Java y América tropical **(99)**, son plantas perennes, suculentas, son desnudas o peludas. Las hojas varían mucho en forma y tamaño, pero la mayoría son carnosas en general cilíndricas, ovales o lineares, y flores en forma tubular o de campana cultivadas a través de sus hojas o por las flores, numerosas especies producen nuevos retoños a partir del margen foliar. Se multiplican a través de

semillas, plántulas o esquejes caulinares obtenidos en primavera o verano ( **100,102,103** ). Las flores, al contrario de muchas otras Crasuláceas, no se presentan en número de 5, sino en grupos de 4 portadores de flores o inflorescencias de otras estructuras; pueden ser de tallas pequeñas o grandes; apuntan hacia arriba o son colgantes; presentan colores variables: blancas, amarillas, verdosas, rosadas violetas y de diversos rojos. Muchas especies de Kalanchoe florecen en el invierno; por lo que están adaptadas al interior, otras tienen floración estival y pueden vivir al aire libre, en climas benignos ( **103** ). Algunas plantas son de días cortos, sensibles a las heladas; mínima 7-15°C. requieren exposición a pleno sol o bien sombra parcial, y sobre suelos bien drenados. Deben regarse desde primavera a otoño, y en verano los riegos han de ser muy escasos y solo ocasionales. En ocasiones, las hojas funcionan con eficiencia en la reproducción vegetativa. En ciertas especies de Bryophyllum, (Kalanchoe sp), algunas porciones del tejido que se localizan en las muescas a lo largo de los bordes de la hoja permanecen en estado meristemático provistos de raíces, es evidente que este tejido se desarrolla en nuevas plantas pequeñas siempre y cuando se mantenga activa la hoja progenitora. Posteriormente, al alcanzar un cierto tamaño las plántulas caen de la hoja al suelo, donde en condiciones favorables, pueden desarrollarse en nuevas plantas individuales ( **104**).

**Kalanchoe gastonis bonnierii (Raym.-Hamet & E.P. Perrier)**

Originaria de Madagascar; es un arbusto de 60 cm de alto; hojas de 16 cm de largo y 4 cm de ancho; con inflorescencias de 30 cm de alto; y flores de color verde pálido (**100**).

**Género Cotyledon**

Este género comprende unas 40 especies son de pequeñas dimensiones arbustivas y subarbustos, suculentos, breñosos, caducifolios y

perennifolios, que se utilizan en jardinería por la diversidad de su follaje que abarca desde hojas perennes o caducas de colores grises y ovales a hojas pequeñas, cilíndricas y de color verde franco. con tallos a veces carnosos y muy hinchados. El periodo de vegetación con regular floración se presenta en invierno o verano según las especies **(99)**. Sensibles a las heladas; mínima de 5 a 7 ° C requieren posición soleada o parcialmente umbría, pero en suelos muy bien drenados. Se multiplican a través de semillas o bien por esquejes caulinareos obtenidos en primavera o verano (**99, 102**).

### **Cotyledon wallichii (Harv)**

Arbusto suculento, caducifolio y breñoso, con una altura de aproximadamente 30 cm, presenta tallos de 3 cm de grueso con hojas verdes, cilíndricas, dispuestas en la extremidad. Después de la caída de las hojas los tallos quedan cubiertos por las hojas basales, produce flores verde amarillas, tubulares de 2 cm de longitud. La floración tiene lugar en otoño **(102)**.



#### IV.- INHIBICIÓN DE LA FERTILIDAD EN LA RATA MACHO CON EXTRACTOS DE Kalanchoe gastonis bonnierii y DE Cotyledon wallichii A NIVEL DE LA MADURACIÓN ESPERMÁTICA EPIDIDIMARIA

##### 1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los últimos 40 años la población se había incrementado a 3 500 miles de millones, a 5.9 mil millones de personas, cada segundo nacen cinco niños, es decir: 200,000/día, 1.4 millones por semana y más de 85 millones/año. México no es la excepción puesto que ocupa el undécimo lugar del mundo en población, ya que en los últimos 50 años la población se cuadruplico. En 1940 la población era de 19.7 millones y se incrementó a 91.2 millones en 1995 (INEGI, 1996) **(105)**.

Los recursos de nuestro planeta no son ilimitados y se están agotando a un ritmo acelerado, precisamente por la conjunción de dos factores: **el crecimiento poblacional y el consumo de energía.**

Es evidente, que la regulación de la fertilidad humana es una preocupación de gran actualidad que requiere adecuada atención. Debido a las tendencias actuales del crecimiento logarítmico de la población mundial, la regulación de la fertilidad humana constituye un tema de estudio muy importante en el área de investigación.

Se ha demostrado que mediante el uso de productos vegetales no hormonales, parece factible regular la fertilidad en los mamíferos **(63)** incluyendo al humano, en forma reversible con efectos indeseables reducidos significativamente **(68, 69)**.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antifertilizante de las plantas Kalanchoe gastonis bonnieri y de Cotyledon wallichii en la rata macho wistar.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar "in vitro" la actividad de los extractos sobre la movilidad espermática.
- 2) Determinar las dosis tóxicas de los extractos de las plantas.
- 3) Evaluar el efecto antifertilizante de los extractos con actividad sobresaliente en las pruebas sobre la rata macho.
- 4) Determinar la reversibilidad del efecto antifertilizante después de 36 días post-tratamiento de los animales que resultaren infértiles.
- 5) Evaluar movilidad, viabilidad, y densidad espermática post-tratamientos.
- 6) Cuantificar en los espermatozoides la cantidad de colesterol y fosfolípidos y en el líquido epididimario, la carnitina, proteínas, carbohidratos, ácido siálico.

### HIPÓTESIS

El extracto natural crudo acuoso (ENCA) de Kalanchoe gastonis bonnieri y de Cotyledon wallichii afecta en forma reversible la fertilidad de la rata macho wistar, con cambios bioquímicos en los espermatozoides y en el líquido epididimario.

### JUSTIFICACIÓN

A) Se ignora él o los mecanismos involucrados en el efecto anticonceptivo descrito empíricamente mediante el uso del extracto de algunas plantas Crasuláceas.

**B)** Es importante validar científicamente el uso tradicional de algunas plantas con fines anticonceptivos, para generar potencialmente el desarrollo de una alternativa que permita regular la fertilidad en el varón.

**C)** Se desconocen las características químicas del o los compuestos activos que poseen estas plantas.

### **METAS**

**1.-** Planteamiento potencial de estrategias para interferir con la adquisición de la habilidad fertilizante del gameto masculino con plantas de la familia Crassulaceae.

**2.-** Contribuir al conocimiento de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos inducidos con productos naturales de la medicina tradicional relacionados con la anticoncepción masculina.

## PROGRAMA DE TRABAJO

a.- **TIPO DE ESTUDIO:** Prospectivo, longitudinal y comparativo entre especies.

b.- **VARIABLE INDEPENDIENTE:** Extractos de plantas de la familia Crassulaceae.

**NIVELES:** Kalanchoe gastonis bonnieri

Cotyledon wallichii

Controles.

c.- **VARIABLES DEPENDIENTES:** Viabilidad, movilidad, y fertilidad. Proteínas, carbohidratos, ácido siálico, fosfolípidos y carnitina,

**CRITERIOS DE INCLUSIÓN:** Ratas hembras y machos fértiles con edad de 2.5 meses, de la misma camada y con pesos entre 280 y 320 g.

**CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:** Ratas que presenten pérdida de peso y que presenten algún proceso infeccioso.

## V.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.- ESTUDIOS "IN VITRO" PRIMERA ETAPA DEL TRABAJO

**a.- Obtención de los extractos de Kalanchoe gastonis bonnieri y Cotyledon wallichii .-** Las plantas se recolectaron entre los meses de Noviembre a Febrero. Inmediatamente después de la recolección, se llevó a cabo en forma paralela su identificación taxonómica (**fig. 3**). Los extractos de las plantas se obtuvieron utilizando las hojas que fueron cortadas en fragmentos pequeños y mediante presión mecánica, se obtuvo el extracto natural crudo acuoso (ENCA) de cada planta. Los extractos se clarificaron por centrifugación en una centrifuga GLC-1 en un rotor SORVAL Type M a 3000 r.p.m. durante 15 min. para eliminar partículas en suspensión. En los extractos se determinaron sólidos totales, se congelaron y se almacenaron a  $-30^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

**b.- Obtención y preparación de los espermatozoides.**

Ratas adultas machos con peso promedio de  $300 \pm 20$  g se sacrificaron, se sustrajeron y disectaron los epidídimos y por ligamiento entre el corpus y la cauda, se separaron estas regiones. A nivel de la cauda, se hizo un corte sagital, se abrieron las dos mitades y se indujo la salida conjunta de espermatozoides y el líquido epididimario los que fueron aspirados con una jeringa para insulina sin aguja. Se utilizó varias veces medio Ham F-10 (pH = 7.4) para recuperar totalmente el aspirado de los dos epididimos en 10 ml de medio; se centrifugaron en una centrifuga GLC-1 en un rotor SORVAL Type M a 800 r.p.m. por 15 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó 3 veces la pared del tubo y finalmente se resuspendieron los espermatozoides en medio Ham F-10, y se contaron las células ajustando la suspensión a  $10^8$  espermatozoides por ml.



**Fig. 3.-** Fotografías de las plantas empleadas en el estudio. **A.-** Kalanchoe gastonis bonnieri, **B.-** Cotyledon wallichii, cultivadas en los jardines del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del I.M.S.S. El aspecto que presentan ambas plantas corresponde al período de máxima actividad.

### **c.- Efecto fisiológico: movilidad espermática.**

Se realizaron experimentos de actividad "in vitro" con 10  $\mu$ l de los ENCAS equivalentes a 300  $\mu$ g de sólidos totales, adicionados a 20 millones de espermatozoides incubados a 37° C en 0.5 ml de medio Ham F-10 (pH=7.4) en ausencia (control) y en presencia de los extractos. Los cambios en la movilidad progresiva se observaron con microscopio con aditamento para contraste de fases (97).

## **2.- ESTUDIOS "IN VIVO", SEGUNDA ETAPA DEL TRABAJO**

### **a.- Toxicidad de los extractos**

Se realizaron pruebas de toxicidad con los extractos de las plantas antes de investigar su efecto antifertilizante. Con dosis únicas variables de sólidos totales contenidos en los ENCAS de Kalanchoe gastonis bonnieri y de Cotyledon wallichii equivalentes a 4, 8 y 13 g /Kg de peso corporal fueron administradas por vía oral a 3 grupos de 5 ratones BALB/c. Se hicieron los registros del estado general de los animales y de los decesos durante 72 h

### **b.- Inhibición de la fertilidad y reversibilidad del efecto con el ENCA de Kalanchoe gastonis bonnieri ( K.g.b.).**

El efecto antifertilizante del ENCA de K.g.b., se investigó en grupos de 15 ratas machos wistar adultos y fértiles con pesos de  $330 \pm 20$  g y que permanecieron alimentadas con una dieta balanceada de Chow purina bajo condiciones controladas de temperatura a 25° C y con ciclos alternos de luz-oscuridad de 12 horas y libre acceso al agua y al alimento. Al primer grupo formado de 15 ratas a las que se les administró por vía oral durante 30 días alícuotas del ENCA equivalentes a 150 mg de sólidos totales/Kg de peso corporal (50 veces menor a la concentración de la DL<sub>50</sub>), y agua al grupo control.

A las 24 h después de los tratamientos, 10 animales de cada grupo se aparearon durante 8 días con hembras fértiles, después los machos se

retiraron y se vigiló la evolución de la preñez. Los machos que resultaron infértiles, se volvieron a aparear con hembras fértiles 30 días después de interrumpir los tratamientos con el objeto de investigar la reversibilidad del efecto **(106)**.

El grupo 2 lo formaron las ratas del grupo 1 que resultaron fértiles, es decir que no mostraron inhibición de la fertilidad; y las cuales se dejaron descansar durante 30 días después de interrumpir los tratamientos con 150 mg/Kg de peso, a las que se les volvió a administrar por vía oral 300 mg/de sólidos totales K gastonis b. por Kg de peso durante 30 días. Después del tratamiento, se aparearon con hembras fértiles durante 8 días, y se vigiló la evolución de la preñez. 30 días después de la última dosis se volvieron a aparear para investigar la reversibilidad del efecto. El grupo 3 lo formaron 17 ratas machos con las mismas características del grupo 1 y se les administraron diariamente durante 30 días alícuotas del extracto equivalentes a 300 mg de mg/Kg de peso. Después de los tratamientos, 10 ratas se aparearon durante 8 días, se separaron los machos y se vigiló la evolución de la preñez. 30 días después de la última dosis se volvieron a aparear para investigar la reversibilidad del efecto.

### **c.- Actividad en la fisiología de los espermatozoides.**

El día del apareamiento 24 h después de la última dosis, 5 y 7 animales de los grupos 1 y 3 y del control se pesaron, sacrificaron; se sustrajeron y pesaron sus testículos, epidídimos y riñones. En los epidídimos por ligamiento entre el corpus y la cauda, se separaron estas entidades y a nivel de la cauda se hizo un corte sagital, se abrieron las dos mitades y se indujo la salida conjunta de los espermatozoides con el líquido epididimario, los que fueron aspirados con una jeringa para insulina sin aguja e inmediatamente se evaluaron la movilidad progresiva y la viabilidad. **(97,107)**. Los aspirados de cada animal se recuperaron por separado en un tubo cónico de plástico utilizando un mililitro de agua desionizada para lograr la recuperación total de cada aspirado. La

separación de los espermatozoides se realizó por centrifugación a 12,000 r.p.m. por 30 minutos en un centrifuga eppendorf 5415C; el sobrenadante se retiró, se midió su volumen y el excedente de un mililitro correspondió al volumen del líquido epididimario.

**Viabilidad.-** Se determinó con la prueba de exclusión del colorante azul de tripano. Se incubaron los espermatozoides a 37 ° C se adicionó el azul de tripano (0.1%) en Ham F-10 (pH = 7.4), después de 3 min. se aplicó la suspensión celular en la cámara de Neubauer y se observó al microscopio para cuantificar el porcentaje de espermatozoides viables, (sin teñir) y el correspondiente al de los espermatozoides no viables (teñidos) **(27)**.

#### **d.- Cambios bioquímicos en los espermatozoides de la cauda y en el líquido epididimario.**

Los espermatozoides separados por centrifugación, se lavaron 2 veces con medio Ham F-10, se contaron y se adicionaron al paquete celular 3 ml de metanol con agitación vigorosa durante 1 minuto introduciendo y retirando una espátula para desestructurar a los espermatozoides, y sin dejar de agitar; se adicionaron 6 ml de cloroformo y se dejaron extrayendo a temperatura ambiente durante 12 h **(108)**. El sistema de extracción se filtró en columna de lana de vidrio y el extracto libre de residuos se lavó para quitar fósforo inorgánico que no es de fosfolípidos por la adición sin mezclar de KCl (0.075 M) en proporción del 1/5 del volumen del extracto lipídico, se dejó el sistema en refrigeración por 18 hs, se retiró la fase superior acuosa y en el extracto lipídico fase inferior se determinaron por los métodos espectrofotométricos correspondientes el fósforo de fosfolípidos y colesterol totales **(109, 110)**.

En el líquido epididimario por interpolación con los métodos espectrofotométricos correspondientes, se determinaron proteínas **(111)**, carbohidratos **(112)**, ácido siálico **(113)**, carnitina **(114)**.

La significancia estadística de las diferencias entre grupos de los cambios bioquímicos estudiados en el líquido epididimario y los espermatozoides, se

obtuvo mediante un análisis de varianza y la prueba "t" de student utilizando para ello el software de estadística SPSSPC.

**e.- Inhibición de la fertilidad y reversibilidad del efecto con Cotyledon wallichii (C.w.).**

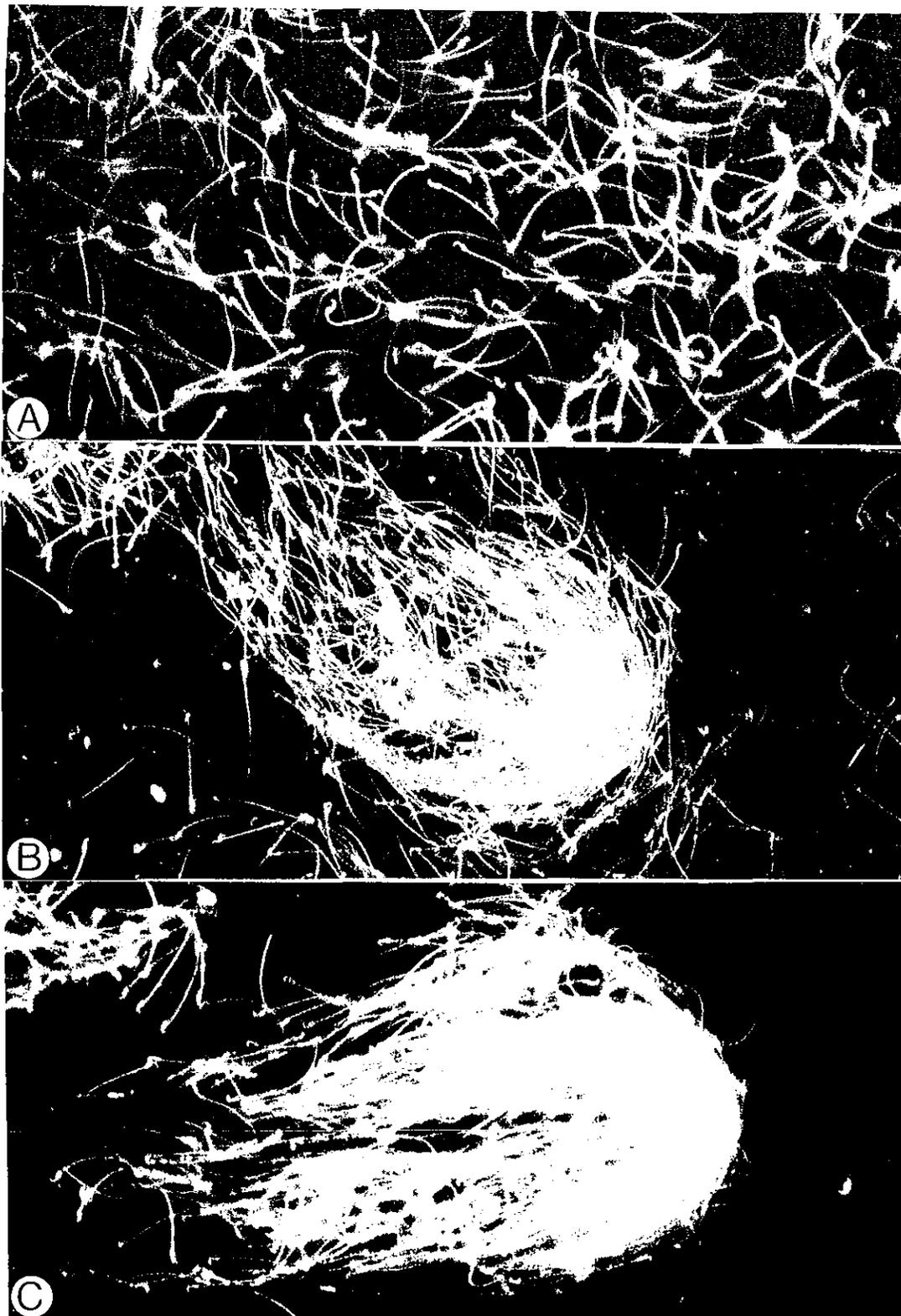
Antes de realizar los experimentos sobre la inhibición de la fertilidad, se determinó la toxicidad como ya se describió, y en base a los resultados obtenidos se determinaron las dosis subletales para inhibir la fertilidad.

Para ello, se utilizaron 17 ratas machos adultos y fértiles (grupo 1) a los cuales se les administró por vía orogástrica 150 mg de sólidos totales/ kg de peso corporal durante 40 días y agua al grupo control. Después del tratamiento 10 animales de cada grupo se aparearon con sus respectivas hembras fértiles, siguiéndose la evaluación de la preñez y la reversibilidad como ya se describió. A un segundo grupo de 17 ratas machos se les administró por vía oral 300 mg/Kg de peso durante 40 días y agua al grupo control. 24 h después de los tratamientos 10 animales de cada grupo se aparearon con hembras fértiles durante 8 días, después los machos se retiraron y se vigiló la evolución de la preñez. Los machos que resultaron infértiles se volvieron a aparear con hembras fértiles después de 30 días de interrumpir los tratamientos con el objeto de evaluar la reversibilidad del efecto. Los 7 animales restantes de los grupos tratados y controles se sacrificaron y se realizó el mismo procedimiento para los cambios bioquímicos como ya se describió con los grupos 1 y 3 tratados con el extracto de Kalanchoe gastonis bonnieri.

## **VI.- RESULTADOS**

### **a.- Estudios "in vitro"**

La adición de 10 µl del extracto natural de ambas plantas equivalentes a 300 µg de sólidos totales a 20 millones de espermatozoides produjeron en forma instantánea el mismo patrón de respuesta: 100 % de inmovilización y aglutinación de los espermatozoides (**Fig 4**).



**Fig. 4. A.-** Aspecto "in vitro" de los espermatozoides de la rata en ausencia del extracto "Control" o en presencia de los extractos de: **B.- Kalanchoe gastonis bonnieri**, **C.- Cotyledon wallichii**, los que produjeron 100 % de inmovilización y aglutinación.

## **b.- Estudios “in vivo”**

### **Toxicidad**

Debido a la demostración “in vitro” del potente efecto inmovilizante-aglutinante sobre los espermatozoides, se realizaron los estudios de toxicidad “in vivo” para poder determinar la dosis efectiva que produzca anticoncepción en la rata macho.

Los estudios de toxicidad con Kalanchoe gastonis bonnieri mostraron que con dosis únicas de 4, 8 y 13 mg de sólidos totales por gramo de peso corporal, se produjo el 20, 20 y 80 % de letalidad. **(Fig. 5)** La DL<sub>50</sub> estimada fue de 11 g/Kg de peso corporal. No se observó letalidad con las mismas dosis para 4, 8 y 13 mg de sólidos totales del extracto de Cotyledon wallichii. **(Fig. 5)**. Con base a esta dosis se determinó la dosis efectiva aproximada que fue de 150 y 300 mg/Kg de peso corporal para inhibir la fertilidad

### **c.- Efecto de los tratamientos sobre la fertilidad**

En los animales tratados con la dosis de 150 mg/Kg de peso corporal de **(K.g.b.)** administradas durante 30 días se observó 50 % de inhibición de la fertilidad con recuperación de ésta en un 100 %, 30 días después del tratamiento (Tabla 1). En base a estos resultados nos pareció razonable aumentar la dosis a 300 mg/Kg durante 30 días a las ratas que resultaron fértiles después de los tratamientos con 150 mg/Kg de peso corporal, estas ratas, ahora mostraron 100 % de inhibición de la fertilidad y con recuperación de la misma de 100% después de 30 días de interrumpir los tratamientos **(tabla 1, Grupo 2)**. Sin embargo, cuando se repitió el experimento con dosis diarias de 300 mg/Kg de peso durante 30 días con animales que no fueron previamente tratados con 150 mg/Kg, el efecto antifertilizante observado fue del 50 % **(Tabla 1, Grupo 3)**.

En el primer grupo de animales tratados con la dosis de 150 mg/Kg del ENCA de **(C.w.)** administradas a 17 ratas macho se observó en 10 animales 50 % de inhibición de la fertilidad con recuperación del 100 % después de 60 días

de los tratamientos. En el segundo grupo de animales tratados con 300 mg/Kg de peso corporal durante 40 días en 10 animales se observó 40 % de inhibición de la fertilidad y con recuperación de la misma de 100% después de 60 días de interrumpir los tratamientos (**tabla 2**).

**d.- Cambios fisiológicos y bioquímicos en los espermatozoides de la cauda y en el líquido epididimario en ratas tratadas con los extractos y sin tratamientos.**

Los animales se pesaron y sacrificaron 24 h después de la última dosis del extracto (de K.g.b. de 150 mg/Kg de peso), los animales del grupo 1 se pesaron, se sacrificaron y se investigó el efecto del extracto sobre los espermatozoides y el líquido epididimario obtenido de la cauda, observándose que la concentración de espermatozoides por animal expresada en millones fue significativamente menor ( $150 \pm 10$ ) con respecto al control sin ningún tratamiento ( $209 \pm 27$ ) (**tabla 3**) en el primer grupo de animales tratados con 150 mg/Kg de K.g.b. El grupo 3 de animales tratados con 300 mg/Kg de peso, la disminución en la concentración de los espermatozoides fue ( $90 \pm 26$ ) con respecto al grupo control ( $209 \pm 27$ ); (**tabla 3**). En contraste con los animales del 1ro y 2do grupo tratados con C.w., no se observaron diferencias en la densidad de los espermatozoides expresada en millones ( $205 \pm 5$  y  $232 \pm 28.02$ ) con respecto al control ( $209 \pm 27$ ); (tabla 3). En relación a la viabilidad en los grupos 1 y 3 tratados con K.g.b. los valores fueron menores ( $33 \pm 2.08$  y  $55 \pm 10\%$ ) respectivamente comparados con el grupo control ( $77 \pm 4\%$ ) (**tabla 3**). En tanto que la viabilidad de los animales tratados con el extracto de C.w. al igual que con K.g.b. esta se vio disminuida en ( $15.2 \pm 4.14$ ) para el grupo 1 y ( $57 \pm 6$ ) para el segundo grupo comparados con el grupo control ( $77 \pm 4$ ).

Con respecto a la movilidad de los espermatozoides, ésta disminuyó significativamente en ambos grupos ( $p < 0.001$ ) de ( $17 \pm 15$  y de  $16 \pm 15$ ) para el grupo 1 y 3 de K.g.b. y de ( $12 \pm 8$  y  $10 \pm 5\%$ ) Para C. w. con respecto al grupo control  $70 \pm 2\%$  (**tabla 3**).

Figura 5

PERFIL DE TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE Kalanchoe gastonis  
bonnieri y Cotyledon wallichii

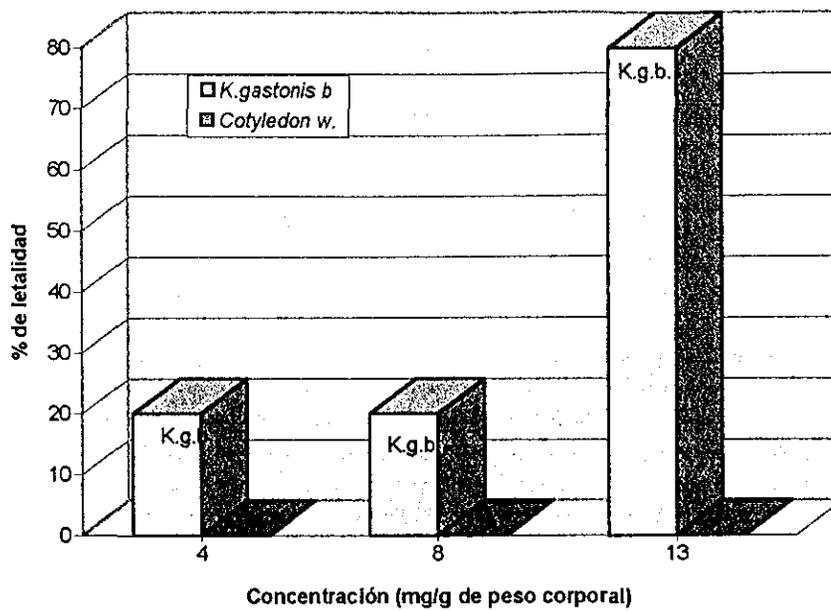


TABLA I

**INHIBICIÓN DE LA FERTILIDAD EN LA RATA MACHO WISTAR CON EL EXTRACTO CRUDO DE Kalanchoe gastonis bonnierii.**

GRUPOS	No DE RATAS EMBARAZADAS	INHIBICIÓN DE LA FERTILIDAD (%)	REVERSIBILIDAD 30 DÍAS POSTRATAMIENTO (%)
control (n = 10)	10/10	0	-----
grupo 1 (n = 10)	5/10	50	100
*grupo 2 (n = 5)	0/5	100	100
**grupo 3 (n = 10)	5/10	50	100

\* Este subgrupo esta representado por las ratas que resultaron fértiles después de 30 días de tratamiento con 150 mg/Kg de peso y que se volvieron a tratar con 300 mg/Kg de peso durante 30 días.

\*\* En el grupo se utilizaron dosis de 300 mg/Kg de peso sin previo tratamiento con dosis de 150 mg/Kg de peso.

TABLA II

**INHIBICIÓN DE LA FERTILIDAD EN LA RATA MACHO WISTAR CON EL EXTRACTO CRUDO DE Cotyledon wallichii.**

GRUPOS	No DE RATAS EMBARAZADAS	INHIBICIÓN DE LA FERTILIDAD (%)	REVERSIBILIDAD (%) 60 DÍAS POS TRATAMIENTO
Control (n = 10)	10/10	0	-----
*Grupo 1 (n = 10)	5/10	50	100
**Grupo 2 (n = 10)	4/10	40	100

\* En el grupo 1 se utilizaron dosis de 150 mg/Kg de peso corporal durante 40 días.

\*\* En el grupo 2 se utilizaron dosis de 300 mg/Kg de peso corporal durante 40 días.

No se observaron diferencias en los pesos de los epidídimos de los animales tratados en el primer y tercer grupos con K.g.b. ( $0.62 \pm 0.04$  y  $0.57 \pm 0.04$  g) respectivamente. En los grupos tratados con el extracto de C. w. si se observó un incremento moderado pero significativo ( $0.63 \pm 0.03$  y  $0.63 \pm 0.01$  g) respectivamente comparados con el grupo control ( $0.60 \pm 0.03$  g) (**tabla 4**).

Con respecto al peso testicular este disminuyó moderadamente solo en el grupo 3 tratados con la dosis mayor de K.g.b. ( $1.69 \pm 0.11$ g) comparativamente al control ( $1.85 \pm 0.17$  g) (**tabla 4**). El peso de los riñones ( $1.56 \pm 0.17$  y  $1.52 \pm 0.08$  g) de los animales de los grupos 1 y 3 tratados con el extracto de K.g.b. no fueron diferentes con los del grupo control ( $1.60 \pm 0.16$  g). Solamente los tratamientos con el extracto de C.w. produjeron disminución altamente significativa en los dos grupos tratados con C. w. ( $1.35 \pm 0.09$  y  $1.35 \pm 0.11$ g) respectivamente (**Tabla 4**). Con respecto al peso corporal no se observaron diferencias en los animales tratados con ambas plantas (**tabla 4**).

### **Cambios bioquímicos**

Las concentraciones de las proteínas del líquido epididimario fueron menores en el grupo 1 tratado con K.g.b. ( $2.83 \pm 0.02$ ), comparativamente al control ( $4.85 \pm 0.80$ ) (**tabla 5**), en contraste con los grupos 1 y 2 tratados con C. w. en los que las concentraciones fueron mayores ( $8.94 \pm 0.34$  y  $7.23 \pm 1.20$ ) comparativamente al grupo control ( $4.85 \pm 0.80$ ). La concentración de carbohidratos no se afectó en los grupos 1 y 3 tratados con el extracto de K.g.b. ( $0.87 \pm 0.02$  y  $1.04 \pm 0.57$ ) comparativamente al grupo control ( $0.76 \pm 0.15$ ) (**Tabla 5**). En contraste con los grupos 1 y 2 tratados con C. w. en los que se encontró una moderada disminución en la concentración de carbohidratos ( $0.53 \pm 0.10$  y  $0.62 \pm 0.16\%$ ) respectivamente (**tabla 5**). El ácido siálico se encontró significativamente disminuido solamente en el grupo 1 tratado con K.g.b. ( $0.96 \pm 0.2$ ), con respecto al control ( $2.14 \pm 0.88$ ) (**tabla 5**). En los grupos 1 y 2 tratados con C.w. no se encontraron diferencias en

comparación al grupo control (**tabla 5**). Los cambios en las concentraciones de carnitina en los grupos 1 y 3 tratados con K.g.b. fueron significativamente menores ( $0.14 \pm 0.002$  y  $0.08 \pm 0.002$  %) comparativamente al control ( $0.21 \pm 0.09$ ). Este comportamiento fue semejante en los grupos 1 y 2 tratados con el extracto de C.w. ( $0.17 \pm 0.06$  y  $0.11 \pm 0.02$  %) respectivamente (**tabla 5**).

Durante el tránsito de los espermatozoides del caput a la cauda durante el proceso de maduración epididimaria, sus membranas se modifican substancialmente debido a un proceso de remodelación molecular en el que participan de manera importante entre otros la composición y cantidad de los lípidos. En este sentido, nuestros resultados demuestran que la concentración de fosfolípidos en los espermatozoides, no se modificó con respecto al grupo control (**Tabla 6**). El colesterol se encontró disminuido solamente en el grupo 2 tratado con C.w. y consecuentemente la relación colesterol/fosfolípidos resultó menor en 48 % comparativamente al control (**tabla 6**).

TABLA No III

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LA FISIOLÓGÍA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE LA CAUDA DEL EPIDIDIMO DESPUES DE LOS TRATAMIENTOS.

GRUPOS	DENSIDAD ESPERMÁTICA (X10 <sup>6</sup> )	VIABILIDAD (%)	MOVILIDAD (%)
Grupo control	209 ± 27	77 ± 4	70 ± 2
Grupo 1 <u>Kalanchoe gastonis bonnierii</u> (150 mg/Kg)	150 ± 10 <sup>b</sup>	33 ± 2.08 <sup>b</sup>	17 ± 15 <sup>b</sup>
*Grupo 3 <u>Kalanchoe gastonis bonnierii</u> (300mg/Kg)	90 ± 26 <sup>b</sup>	55 ± 10 <sup>b</sup>	16 ± 15 <sup>b</sup>
Grupo 1 <u>Cotyledon wallichii</u> (150 mg/Kg)	205 ± 5	15.2 ± 4.14 <sup>b</sup>	12 ± 8.3 <sup>b</sup>
Grupo 2 <u>Cotyledon wallichii</u> (300mg/Kg)	232.6 ± 28.02	57 ± 5.8 <sup>a</sup>	10 ± 5 <sup>b</sup>

Las cantidades representan valores promedio ± las desviaciones estándar de 7 determinaciones en todos los grupos. (p< 0.01)<sup>a</sup>, (p<0.001)<sup>b</sup>.

\* Animales que recibieron tratamiento previo con 150 mg/Kg de peso.

TABLA No IV.

**EFFECTO DE LOS EXTRACTOS SOBRE LOS PESOS CORPORAL Y DE  
ÓRGANOS DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS.**

GRUPOS	EPIDÍDIMO	TESTÍCULO	RIÑONES	PESO CORPORAL
Grupo control	0.60 ± 0.03	1.85 ± 0.17	1.60 ± 0.16	423 ± 25
Grupo 1 <u>Kalanchoe gastonis bonnierii</u> (150 mg/Kg)	0.62 ± 0.04	1.88 ± 0.20	1.56 ± 0.17	438 ± 31
Grupo 3 <u>Kalanchoe gastonis bonnierii</u> (300mg/Kg)	0.57 ± 0.04	1.69 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.08	364 ± 50
Grupo1 <u>Cotyledon wallichii</u> (150 mg/Kg)	0.63 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.10	1.35 ± 0.09 <sup>c</sup>	387 ± 27
Grupo 2 <u>Cotyledon wallichii</u> (300mg/Kg)	0.63 ± 0.01 <sup>b</sup>	1.79 ± 0.10	1.35 ± 0.11 <sup>c</sup>	389 ± 33

Las cantidades expresan gramos y son valores promedio ± las desviaciones estándar de 7 determinaciones en todos los grupos. (p < 0.01)<sup>a</sup>, (p < 0.05)<sup>b</sup>, (p < 0.001)<sup>c</sup>.

TABLA No V

COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA DEL LÍQUIDO EPIDIDIMARIO DE ANIMALES CON Y SIN TRATAMIENTOS DE LOS EXTRACTOS.

GRUPOS	PROTEÍNAS	CARBOHIDRATOS	AC.SIÁLICO	CARNITINA
Grupo control	4.85 ± 0.80	0.76 ± 0.15	2.14 ± 0.88	0.21 ± 0.09
Grupo 1 <u>Kalanchoe gastonis bonnierii</u> (150 mg/Kg)	2.83 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.87 ± 0.02	0.96 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.14 ± 0.002 <sup>a</sup>
Grupo 3 <u>Kalanchoe gastonis bonnierii</u> (300mg/Kg)	6.07 ± 3.96	1.04 ± 0.57	1.45 ± 0.71	0.08 ± 0.002 <sup>b</sup>
Grupo 1 <u>Cotyledon wallichii</u> (150 mg/Kg)	8.94 ± 0.34 <sup>b</sup>	0.53 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.65	0.17 ± 0.06 <sup>a</sup>
Grupo 2 <u>Cotyledon wallichii</u> (300mg/Kg)	7.23 ± 1.20	0.62 ± 0.16	2.06 ± 0.32	0.11 ± 0.02 <sup>b</sup>

Las cantidades están expresadas en g/100 ml del líquido epididimario y son valores promedio ± las desviaciones estándar de 7 determinaciones en todos los grupos. (p<0.05)<sup>a</sup>, (p<0.001)<sup>b</sup>.



TABLA No VI

**CONCENTRACIÓN LIPÍDICA DE LOS ESPERMATOZOIDES OBTENIDOS DE LA CAUDA DEL EPIDIDIMO DE ANIMALES TRATADOS CON LOEXTRACTOS DE LAS PLANTAS Y CONTROLES**

GRUPOS	COLESTEROL	FÓSFORO	$\frac{\text{COLESTEROL}}{\text{FÓSFORO LIPIDOS}}$
Grupo control	1.09 $\pm$ 0.25	0.86 $\pm$ 0.23	1.28
Grupo 1 <u>Kalanchoe</u> <u>gastonis bonnierii</u> (150 mg/Kg)	0.99 $\pm$ 0.002	0.83 $\pm$ 0.009	1.19
Grupo 3 <u>Kalanchoe</u> <u>gastonis bonnierii</u> (300mg/Kg)	1.28 $\pm$ 0.30	1.10 $\pm$ 0.32	1.16
Grupo 1 <u>Cotyledon wallichii</u> (150 mg/Kg)	1.18 $\pm$ 0.10	1.12 $\pm$ 0.03	1.05
Grupo 2 <u>Cotyledon wallichii</u> (300mg/Kg)	0.81 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	1.2 $\pm$ 0.5	0.67

Las cantidades son valores promedio  $\pm$  las desviaciones estándar del colesterol y PO<sub>4</sub> de fosfolípidos expresadas en micromoles/10<sup>9</sup> espermatozoides. Se hicieron 7 determinaciones en todos los grupos (p<0.001)<sup>a</sup>.

## VII.- DISCUSIÓN

La anticoncepción masculina con sulfasalazinas es aún poco estudiada por lo que no es posible valorar en forma definitiva esta práctica anticonceptiva, además de que se utilizan concentraciones muy altas y no refieren efectos colaterales. Por lo que respecta al tamoxifén, ciertamente el efecto antifertilizante descrito es interesante porque se logra con concentraciones pequeñas y además el efecto es reversible **(76)**. Posiblemente los autores continúan investigando otros efectos colaterales como por ejemplo funcionalidad hepática, renal, cardíaca y cambios hematológicos; lo cual con resultados adecuados, se sustentaría esta práctica anticonceptiva para realizar los estudios preclínicos correspondientes.

En relación a la anticoncepción masculina con combinaciones de acetato de medroxiprogesterona/testosterona, enantato de testosterona o testosterona sola, con estas dos últimas el efecto es más demostrativo; aunque los tratamientos son muy prolongados, y acompañados de inconvenientes muy serios, como incremento progresivo en los triglicéridos, alteración del carácter y acné durante el tratamiento **(78)**; algunos pacientes responden rápidamente y a los tres meses se vuelven oligozoospermicos agudos y más tarde otros pacientes se vuelven azoospermicos y algunos continúan con azoospermia permanente **(79, 80)**, esto es que el efecto no siempre es reversible. Además durante los tratamientos se produce una disminución significativa en los valores de la lipoproteína HDL-colesterol, lo que parece generar un riesgo para el padecimiento de enfermedades cardíacas **(81, 82)**.

En relación a los estudios sobre anticoncepción masculina con plantas, en algunos casos esta alternativa parece ser adecuada por la poca toxicidad que se reporta particularmente con algunas plantas que son ricas en glicósidos como en algunas que pertenecen a la familia de las Celastraceas de las que incluso en una de ellas ya se ha identificado la estructura molecular del principio activo para producir infertilidad de manera reversible sin efectos

colaterales (93). Sin embargo hasta ahora son pocas las plantas que se estudian para esta práctica anticonceptiva, lo que sugiere continuar investigando con esta línea debido a que es posible que haya otras plantas aún no descritas y que también son ricas en glicósidos como es el caso de nuestro trabajo (datos no publicados), con el cual hemos demostrado por un lado baja toxicidad y aparentemente sin efectos colaterales como indirectamente lo demuestra la no diferencia de los pesos corporal y de órganos comparativamente con los controles. En este sentido, Kalanchoe gastonis bonnierii y Cotyledon wallichii especies utilizadas en este trabajo, no son la excepción ya que se ha demostrado "in vitro" potente efecto de inmovilización-aglutinación de los espermatozoides.

Considerando la movilidad progresiva como una de las características más importantes relacionadas con la fertilidad del gameto masculino y habiendo demostrado "in vitro" gran actividad aglutinante-inmovilizante sobre los espermatozoides con los ENCA's de K.g.b. y de C. w., era razonable investigar el efecto antifertilizante de estas plantas en la rata wistar macho. Antes de iniciar esta demostración era necesario investigar el grado de toxicidad de los extractos. Los estudios de toxicidad con Kalanchoe gastonis bonnierii con dosis de 4, 8 y 13 g/Kg produjo 20, 20 y 80% de letalidad y la DL<sub>50</sub> calculada fue de 11 g/Kg de peso. En el caso de Cotyledon wallichii con estas mismas dosis se observó 0 % de letalidad, lo cual pone de manifiesto que el efecto del extracto no es tóxico comparado con el extracto de K.g.b.

Otros estudios de toxicidad han reportado que el extracto de otras Kalanchoes (K. daigremontana, K. fedtschenki y K. tubiflora) con dosis de 8 y 10 g/Kg de peso administradas en pollos de 2 semanas producen resultados muy semejantes a los nuestros. Sin embargo con K. tomentosa y K. beharensis y 4 cultivos de K. blossfeldiana y K. flammea no fueron tóxicas con dosis mayores de 10 g/Kg (106).

Para demostrar el efecto anticonceptivo en la rata macho, a un grupo se administraron por vía oral durante 30 días dosis diarias de 150 mg/g de peso,

produciendo solo el 50% del efecto antifertilizante (**tabla 1**). Este efecto puede deberse en parte a la dosis utilizada, ya que a diferencia de otros estudios con Kalanchoe blossfeldiana con dosis diarias de 200 mg/Kg produce 75 % de inhibición de la fertilidad. Por otro lado era factible aumentar la dosis ya que si con 150 mg/Kg observamos un 50 % de efecto anticonceptivo y reversible en un tiempo relativamente corto, era probable que al doblar la dosis tuviéramos el efecto de 100 %. De esta manera a los animales del grupo 1 los cuales ya habían sido previamente tratados con 150 mg/Kg de peso se dejaron descansar 30 días; y al día siguiente se inició un 2do ciclo de tratamiento con 300 mg/Kg de peso por otros 30 días, logrando así el 100 % de inhibición de la fertilidad y 100 % de reversibilidad (**tabla 1**). Esto indica que posiblemente los animales de alguna manera quedaron más sensibles debido al primer tratamiento. Por lo tanto para el caso de K.g.b. es factible proponer que además de la dosis la forma de administrar el extracto es fundamental para lograr el 100% de actividad anticonceptiva.

En el caso de Cotyledon wallichii al igual que con K.g.b. el experimento se inició con 150 mg/Kg de peso a otro 40 días, se observó un 50 % de efecto inhibitorio con 100 % de recuperación de la fertilidad, 60 días después de los tratamientos (**tabla 2**). Al ver este efecto de 50 % se decidió aumentar la dosis de 150 a 300 mg/g de peso a otro grupo de animales esperando que el tratamiento fuera dosis dependiente para obtener el 100 % de inhibición. Sin embargo después de haber administrado 300 mg/Kg de peso por 40 días se observó 40 % de inhibición y no de un 100 % como se esperaba (**tabla 2**). Por lo tanto aquí el efecto parece no ser dependiente de la dosis y que la farmacocinética del producto activo es de comportamiento diferente. No obstante sería interesante realizar el mismo procedimiento que se llevó a cabo con el primer grupo de K.g.b. en el cual parece ser que los animales se sensibilizaron con un primer tratamiento y de esta manera se podría lograr el 100% de inhibición de la fertilidad (**tabla 1**). Además sería importante

aumentar la dosis, ya que los resultados de toxicidad no mostraron letalidad alguna con las dosis empleadas.

Estudios previos realizados por nuestro grupo relacionados con la regulación de la fertilidad masculina con plantas Crasuláceas como: Echeveria gibbiflora, Sedum oxipetalum, Kalanchoe blossfeldiana y Kalanchoe flammea han demostrado tener potente efecto tanto "in vitro" como en "in vivo", con estas dos últimas plantas con las que se ha demostrado que con dosis de 200 mg/Kg de peso administrado por vía oral durante 40 días se produce en promedio 73 % de inhibición de la fertilidad. Posiblemente si aumentáramos las dosis subletales lograríamos mayor efecto anticonceptivo, lo que parece ser factible debido a la baja toxicidad observada con los extractos, con la ventaja adicional de que el efecto anticonceptivo es reversible.

Fue muy importante haber demostrado que parte del efecto inhibitorio de la fertilidad fue 100% reversible después de 30 días de interrumpidos los tratamientos. Este comportamiento indirectamente podría indicarnos que los niveles de testosterona no fueron afectados y por ende ni la espermatogénesis debido a los tratamientos con los extractos de las plantas y que el efecto antifertilizante se produce a nivel epididimario. Este efecto es el que reportan otros autores cuando utilizan preparaciones ricas en glicósidos **(91,92)**.

Por otro lado, en relación a los cambios bioquímicos después de los tratamientos se observó una disminución significativa en la densidad espermática, viabilidad y movilidad después de los tratamientos **(tabla 3)**. Este efecto podría deberse a un moderado efecto a nivel testicular, lo cual podría explicar en parte la reversibilidad del efecto inhibitorio de la fertilidad ya descrito. La disminución en la densidad espermática podría relacionarse con una discreta actividad a nivel de la espermatogénesis y con la digestión de espermatozoides, debido a la actividad de enzimas liberadas de las vesículas presentes en el líquido epididimario y que son ricas en enzimas de tipo

lisosomal como glico-hidrolasas **(115)**. Nuestros resultados parecen indicar que, las características bioquímicas del líquido epididimario al menos a este nivel (cauda) fueron modificadas y con ello, la calidad de las interacciones con los espermatozoides que normalmente deben suceder para la adquisición y mantenimiento de la capacidad fertilizante, lo cual podría explicar en parte, el efecto inhibitorio de la fertilidad. En los mamíferos se ha establecido que una de las principales características del epitelio epididimario es la absorción **(116)**. La región proximal del epidídimo de la rata ha mostrado efectividad en la absorción de agua, hasta de un 50 % y 90 % en el de toro y carnero **(117)**. Las células de la región distal del epidídimo parecen estar también involucradas en la absorción de moléculas de bajo y alto peso molecular **(118)**. Debido a estas características de absorción del epidídimo y a que el compuesto con efecto inmovilizante-aglutinante y anticonceptivo es de peso molecular bajo 1200 Daltones (datos no publicados), se sugiere que su absorción sería posible para su internalización y tal vez acumulación en el lumen epididimario y ejercer su efecto en la estructura de los espermatozoides y en el líquido epididimario y por ende en la fertilidad.

Nuestros resultados en el líquido epididimario demuestran cambios notables producidos por los tratamientos, particularmente en carnitina con disminución altamente significativa ( $p < 0.001$ ) en todos los tratamientos. Es importante enfatizar que la absorción de la carnitina hacia el lumen del caput proximal del epidídimo tiene lugar a través de un sistema acarreador, que es dependiente de tiempo con un Km aproximado de 25  $\mu\text{m}$  y  $V_{\text{max}}$  de 0.65  $\mu\text{moles adsorbidos/min/mm}^3$  de volumen tubular. Cuando los espermatozoides entran al caput del epidídimo son inmóviles en un medio con baja concentración de L-carnitina y adquieren movilidad durante su tránsito a la cauda del epidídimo paralelamente a un incremento en la concentración de la carnitina. La alta concentración de la carnitina en la región de la cauda y el desarrollo de la capacidad para la movilidad de los espermatozoides son

mantenidas por el transporte de la carnitina de la sangre al lumen del epidídimo **(119)**.

En este sentido, como la carnitina mostró la mayor disminución, esto podría indicar que la permeabilidad del epitelio epididimario se encuentra disminuída debido a los tratamientos. El gradiente de concentración de carnitina y acetil-carnitina del caput a la cauda del epidídimo ha sido demostrado en varias especies **(120,121,122)** y se ha sugerido que la acetil-carnitina sirve como un sustrato energético para los espermatozoides al transitar el conducto epididimario. Más aún, se ha demostrado una estrecha correlación con el desarrollo de la fertilidad de los espermatozoides y la carnitina, por ejemplo: los espermatozoides de la parte más distal del corpus solo fertilizaron el 15% mientras que los espermatozoides de la cauda fertilizaron 89% **(123)**. La acumulación de la carnitina es un proceso integral de la maduración de los espermatozoides lo cual ha sido plenamente sustentado al demostrar que el perfil de la fertilidad de espermatozoides es diferente, dependiendo de la región del epidídimo de la cual se hayan separado. La consecuencia probable de la acumulación de la carnitina durante la maduración es que gametos maduros han aumentado su capacidad en el metabolismo energético utilizado para mantener la movilidad vigorosa inmediatamente después de la eyaculación **(124)**. La disminución de la carnitina podría influir en parte en la concentración de la acetilcarnitina, afectando la eficiencia del funcionamiento en el transporte de grupos acilo del citoplasma hacia el interior de la mitocondria y consecuentemente reducir la incorporación de acetilos a este organelo, afectando el sistema regulador de energía para la movilidad del espermatozoide por la disminución de los grupos acetilo disponibles para ser oxidados por la vía del ciclo del ácido cítrico.

Los carbohidratos que se encuentran presentes en el plasma seminal se encuentran libres y parcialmente unidos a proteínas (glicopéptidos y glicoproteínas). Los carbohidratos libres están predominantemente en forma de fructuosa, sin embargo existen pequeñas cantidades de glucosa y otros

monosacáridos, algunos como el inositol y sorbitol se encuentran unidos a proteínas, sin embargo se pueden encontrar en forma libre, otros carbohidratos que van desde el ácido siálico, glucosa, manosa, galactosa y fucosa se encuentran por lo regular unidos a proteínas. En este sentido, el ácido siálico se encuentra 95 % unido a proteínas del plasma seminal ( 16 ) este aminoazúcar se encuentra disminuido significativamente en el grupo 1 tratado con K.g.b. por lo que las sialiltransferasas y glicohidrolasas pudieran estar afectadas con estos tratamientos.

Otro aspecto importante de la maduración del espermatozoide involucra cambios en el contenido y composición de los lípidos. La cantidad de fosfolípidos por célula disminuye aproximadamente 54% en espermias de rata a medida que avanza del caput a la cauda del epidídimo, unos disminuyeron más que otros como: la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina y con muy poca disminución el fosfatidil glicerol, esfingomielina y fosfoinosítolidos. Los ácidos grasos de 18 carbonos (oleato y linoleato) disminuyeron y aumentaron los ácidos con C<sub>20</sub> y C<sub>24</sub> con más insaturaciones como el docosapentanoico (C<sub>22:5, n-6</sub>). Cambios en la composición de ácidos grasos de la membrana así como en la cantidad de los esteroides individuales, pueden ser la causa principal de la fluidez membranal de los espermatozoides (125). Los cambios más notables fueron un incremento del desmosterol y colesterol sulfato y disminución en los niveles de colesterol durante la maduración (126).

La membrana plasmática generalmente consiste de mitad lípidos y mitad proteínas (127). En la mayoría de las células animales, la membrana plasmática contiene cantidades significativas de colesterol organizado en forma alterna con los fosfolípidos de la bicapa lipídica (54, 128). En los espermatozoides de humano la relación de colesterol fosfolípidos (C/P) es cercana a la unidad y cuando estas proporciones son anormales, trae como resultado un incremento anormal en la permeabilidad de la membrana, lo que podría afectar la capacidad del espermatozoide para controlar la concentración de calcio y pH intracelular debido a que los componentes hidrofóbicos de las

proteínas transportadoras de la membrana, establecen contacto con la bicapa lipídica **(129)**.

En muchas células animales, la alteración de la relación (C/P) es un importante mecanismo para regular la fluidez y permeabilidad de la membrana; estas dos propiedades de la membrana normalmente se incrementan con la disminución del (C/P). La membrana plasmática de espermatozoides no capacitados de la mayoría de las especies de mamíferos estudiados, tienen un alto valor de (C/P). El espermatozoide humano contiene cantidades altas de colesterol alcanzando el 50% (fracción mol) de los lípidos de la membrana plasmática **(54)**.

Con respecto a la composición de colesterol y fosfolípidos de los espermatozoides, no se encontraron variaciones significativas con excepción del grupo 2 tratado con el extracto de C.w. en el que se encontró disminuido el colesterol en 45 % y consecuentemente disminuida en 48 % la relación C/P aumentando de manera anormal la fluidez y permeabilidad membranar **(tabla 6)**. Aunque no es posible postular aún algún mecanismo de acción de o los principios activos de los extractos, parece factible proponer su acción directa sobre el mecanismo de acción fibrilar y mitocondrial, ya que ambos están vinculados directamente con el sistema regulador de energía de los espermatozoides; afectando por ende la viabilidad y la movilidad significativamente.

Por otra parte, es interesante comentar que en el contexto de la Biología Reproductiva, los mayores avances en el conocimiento clínico y básico durante la segunda mitad de este siglo, han sido realizados con increíble rapidez. Al respecto, la contribución de científicos mexicanos en ambas áreas básica y clínica incuestionablemente han desempeñado un papel muy importante en este avance

**(130)**. La importancia de las contribuciones de todos estos científicos indudablemente refleja el esfuerzo e interés de ellos y de las instituciones de investigación en la producción científica de alta calidad en el campo de la

Biología Reproductiva en nuestro país. Sobre la Bioquímica, Mercado **(131)**, Rosado **(132)**, Huacuja **(133,134)** Delgado **(135)** y metabolismo del espermatozoide Hicks, **(136, 137)** han ganado especial lugar entre algunas de las más importantes contribuciones biomédicas generadas en México **(130)**. En el aspecto clínico las contribuciones de mayor importancia en anticoncepción, pueden mencionarse los estudios de Rudel, Martínez- Manatou y colaboradores sobre el empleo de dosis bajas de progestágenos, como herramientas para el control de la fertilidad **(138, 139, 140)** y para estos mismos fines el empleo de diferentes dosis de estrógenos sintéticos, para suprimir la ovulación **(141)**; en Neuroendocrinología clínica, Gual en estrecha colaboración con Andrew Shally (Premio Nobel en Medicina y Fisiología) caracterizaron los efectos clínicos y el uso de factores inhibitorios y liberadores de gonadotrofinas (LH-RH o GnRH) **(142,143)**. Sin embargo, estos estudios tuvieron su impacto importante en la Biología Reproductiva de la mujer y solo en los últimos 15 años es que se ha puesto atención a la regulación de la fertilidad masculina logrando interesantes hallazgos con la utilización de diferentes fármacos.

En el apartado referente a la anticoncepción masculina con diferentes fármacos, tanto sintéticos como naturales, hemos observado que con dosis y tiempos de tratamientos variables en todos los casos ha sido posible afectar en mayor o menor grado la fertilidad, aunque en muy pocos casos los efectos colaterales son moderados, llegando incluso a producir azoospermia permanente. Es evidente que aún se requieren más investigaciones para sustentar de manera ventajosa el uso definitivo en la clínica de alguno de los fármacos referidos. En ese sentido, solo en pocas excepciones ya ha sido posible utilizando productos no hormonales de origen vegetal **(91,92)**.

Los mecanismos que regulan la interacción entre los compartimientos endócrino y canalicular son extremadamente sensibles a cambios ambientales, de acuerdo a esto, muchas sustancias son capaces de alterar este equilibrio. En consecuencia, no debería sorprendernos el hecho de que diferentes

entidades del sistema reproductor masculino, sean susceptibles de ser agredidas con fármacos que tienen muy diferentes características en sus estructuras moleculares (**Fig. 2**) lo que sugiere pensar en la posibilidad de encontrar en las plantas un principio activo, con suficiente actividad anticonceptiva reversible y con mínimos efectos adversos. Este razonamiento parece factible a nivel del epidídimo, por las características de permeabilidad del epitelio de este órgano (**116**) y debido a que se están afectando precisamente alguno de los aspectos morfológicos, fisiológicos o bioquímicos del espermatozoide, que en conjunto representan el capítulo final de la espermatogonia para diferenciarse en el gameto masculino maduro con la adquisición de la capacidad fertilizante (**29**).

En el mismo apartado relacionado con la anticoncepción masculina con diferentes fármacos, es que, hasta ahora son pocas las plantas con características vinculadas con la anticoncepción masculina; esto más bien se debe a que la práctica anticonceptiva con plantas en el macho es muy reciente, las investigaciones formales con esta orientación han tenido su mayor expresión en el ámbito científico tan solo en los últimos 15 años; lo cual sugiere continuar investigaciones sobre la regulación de la fertilidad en el macho con productos vegetales, ya que es posible que existan otras plantas aún no estudiadas y que también sean ricas en glicósidos como aparentemente es el caso de nuestro trabajo (datos no publicados) o inclusive otro tipo de estructuras con posible efecto anticonceptivo. En este contexto, México es considerado a nivel mundial como el tercer país en poseer importante diversidad vegetal en su territorio (**144**), aún son muy pocas las plantas que han sido estudiadas para regular la fertilidad en el varón; más aún, no hay grupos de investigación interesados en ampliar y profundizar la Biología Reproductiva, específicamente en anticoncepción masculina con fitofármacos. La Organización Mundial para la Salud (OMS), en 1978 consignó que el 66.6 % de la población de los países subdesarrollados solo recurren a la medicina tradicional para resolver sus problemas de salud; estas cifras no han cambiado

de manera considerable en los últimos años. Los hallazgos logrados con nuestro trabajo, nos permiten concluir que las plantas medicinales constituyen una alternativa viable, para resolver en buena medida los problemas de salud en México de manera complementaria. Es importante enfatizar que la investigación en Biología de la Reproducción es una área prioritaria básica de interés para conocer la biología molecular de los gametos, su fisiología y los mecanismos que participan en el proceso reproductivo, y a medida que se avance en estos aspectos; será posible la regulación de la fertilidad masculina en el humano.

Con el presente trabajo se cumplió satisfactoriamente con la demostración del efecto antifertilizante de las plantas Kalanchoe gastonis bonnieri y Cotyledon wallichii en la rata wistar macho; así como con las correlaciones bioquímicas del efecto antifertilizante consideradas en los objetivos del presente estudio a nivel de la cauda del epidídimo; sin embargo resulta importante investigar nuevamente su posible efecto anticonceptivo con las dosis y tiempos adecuados y la forma de administrar los extractos para obtener el 100 % de efecto anticonceptivo, y en base a los resultados obtenidos, descartarse en caso de no cumplir con los requisitos anteriores o de lo contrario aprovechar las plantas en el proyecto de anticoncepción masculina con los extractos de estas plantas.

## VIII.- CONCLUSIONES

- 1.- Los estudios “*in vitro*” de los extractos de las plantas estudiadas poseen potente efecto inmovilizante-aglutinante sobre los espermatozoides.
- 2.- La DL<sub>50</sub> se obtuvo con dosis únicas de 11 g/Kg de peso corporal solamente para el caso de Kalanchoe gastonis bonnieri
- 3.- La dosis subletal promedio para producir el efecto antifertilizante con Kalanchoe gastonis bonnieri y Cotyledon wallichii fue en promedio 40 veces menor a la DL<sub>50</sub>.
- 4.- Dosis diarias de 150 y 300 mg/Kg de peso corporal administradas por vía oral durante 30 y 40 días, producen 50 y 100% de inhibición de la fertilidad.
- 5.- La fertilidad se recupera a los 30 y 60 días después de interrumpir los tratamientos.
- 6.- En el líquido epididimario los cambios bioquímicos más importantes fueron: la disminución de proteínas y la carnitina.
- 7.- Se propone establecer de manera adecuada la forma de administrar el extracto ya que es fundamental para lograr el 100 % de actividad anticonceptiva.
- 8.- El extracto de las plantas posee un principio activo que tiene efecto sobre la fertilidad de la rata macho, el cual por su baja toxicidad sugiere realizar los estudios toxicológicos y preclínicos correspondientes, para proponerlo como un posible anticonceptivo masculino.

**Este trabajo se realizó en la División de Biología del Desarrollo del Centro de Investigación Biomédica de Occidente del Instituto Mexicano del Seguro Social (I.M.S.S.) y fue financiado totalmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) bajo el número de contrato 0479P-N9506.**

## IX .-ESPECTATIVAS

Continuar con los estudios correspondientes para dilucidar la estructura molecular del principio activo y su posible síntesis.

Debido a la baja toxicidad de los extractos de las Kalanchoes, hemos iniciado un estudio sobre posibles efectos adversos producidos durante los tratamientos para inducir el efecto anticonceptivo, mediante las actividades de las enzimas alanina y aspartato amino transferasas; debido a que son enzimas características indicadoras del metabolismo hepático y cardíaco respectivamente así como de las fosfatasas ácida y alcalina y de metabolitos circulantes: ácido siálico, carbohidratos, proteínas, LH, FSH y testosterona. En el hígado se determinarán glicógeno triglicéridos y colesterol. Cortes finos y semifinos del hígado, corazón y riñones serán procesados para evaluar posibles efectos en la estructura de estos órganos.

Las plantas estudiadas son de ciclo biológico anual debido a ello, se ha iniciado un proyecto con el objeto de obtener los metabolitos secundarios de los tejidos de las Kalanchoes cultivadas "in vitro" con actividad inmovilizante-aglutinante de los espermatozoides e "in vivo" con actividad anticonceptiva en el macho. De esta manera será posible proponer la utilización de los cultivos de la planta en biorreactores "in vitro" como un modelo potencialmente explotable para la producción continua de metabolitos secundarios con actividad anticonceptiva.



## X.- BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOTECA CENTRAL

- 1.- Vantman D. Male Reproduction: An Overview.: Reproductive Toxicology and Infertility. Scialli A R. Zinaman M J (Eds). Mc Graw-Hill, Inc. Health professions Division 3-16, 1993
- 2.- Green JD, Harris GW: Observation of the hypophysoportal Vessels of the living rat. J Physiol (Lond) **108**: 359-361, 1949
- 3.- Oliver C, Mical RS, Porter JC: Hypothalamic- pituitary vasculature: Evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk. Endocrinology **101**: 598-604, 1977
- 4.- Yen SSC, Jaffe RB: Reproductive Endocrinology. W.B. Saunders Co. p 36. 1978
- 5.- Vaitu Rartis JL: Gonadotropins and their subunits basic and clinical studies. Recent Prog Horm Res **32**: 289-231, 1976
- 6.- Duface ML, Catt KJ: Gonadotrophin receptors and regulation of steroidogenesis in the testis and ovary. Vitamin Horm **36**: 461-592, 1978
- 7.- Podesta EJ, Dufau ML, Solano AR, Katt KJ: Hormonal activation of protein kinasa in isolated Leydig cells: Eletrophoretic analysis of cyclic AMP receptors. J Biol. Chem **253**: 4994-5001, 1978
- 8.- Dorrington JH, Armstrong DT: Follicle-Stimulating hormone stimulates stradiol 17  $\beta$  synthesis in cultured sertoli cells. Proc Natl Acad Sci. USA **72**: 2677-2681, 1975

- 9.- Van Thiel DH, Sherins RJ: Evidence for specific seminiferous tubular factor affecting follicle-stimulating hormone secretion in man. *J Clin Invest* **51**: 109-119, 1972
- 10.- Sherins RJ: Disorders of male reproduction in: *A review of Endocrinology. Diagnosis and treatment.* Syllabus p 582, 1987
- 11.- Brooks RV: Androgens. In: *Clin Endocrinol Metab* **4**: 503-520, 1975
- 12.- Ralph W, Steven's II: Basic spermatozoa anatomy and physiology for the clinician. Chapter 1 In: *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction.* Acosta AA, Swanson RJ, Ackerman SB. (Eds.) *William's and Wilkins* pp 1-23, 1990
- 13.- Steinberger A: Testicular inhibin *Sem Reprod. Endocrin* **1**: 357-365 1983
- 14.- Dekretser DM And Mc Farlane JR: Inhibin in the male. Mini review *Journal of Andrology* **17**: 179-186, 1996
- 15.- Ling N, Ying S, Ureno N: Pituitary FSH is released by heterodimer of the B subunits from the two forms of inhibin. *Nature* **321**: 779, 1986
- 16.- Mann T, Lutwar Mann C: *Male Reproductive function and semen.* Berlin Springer Verlag, New York. 1981
- 17.- Zaneveld LJD, Chatterton RT: *Biochemistry of male reproduction.* New York: John Wiley and Sons, 1982

- 18.-** Heller CG, Clermont Y : Spermatogenesis in men: An estimate of the duration. *Science* **140**: 184, 1963
- 19.-** Satir R: Basis of flagellar motility in spermatozoa. Current status in: Fawcett DW, Bedford JM (EDS): *Spermatozoon*. Baltimore, Urban and Scchwarzenberg. pp. 81-90, 1979
- 20.-** Gibbens BH: Studies on the mechanism of flagellar movement, In: Fawcett D.W, Bedfor JM (eds.): *The spermatozoon*. Baltimore, Urban and Schwarzenberg pp. 91-97, 1979
- 21.-** Linck RW: Advances in the ultrastructural analysis of the sperm flagellar axoneme, in Fawcett DW., Bedfor JM (eds.): *the spermatozoon*-Baltimore, Urban y Schawarzenberg pp. 99-115, 1979
- 22.-** Silver SJ: Role of epidydimis in sperm maturation. *Urology* **33**: 47-49, 1989
- 23.-** Young WC: A study of the function of the epidydimis. *J Exp Biol* **8**:151, 1931
- 24.-** Orgebin-Crist MC, Danzo BJ, Davies J: Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epidydimis in Hamilton DW, Green RO, (eds.): *Hand book of Physiology* (sec 7: Endocrinology: vol. **5**. Male Reproductive System). Baltimore, William's y Willkins, p 319, 1975
- 25.-** Jones R: Membrane remodeling sperm maturation in the epidydimis. *Oxf Rev Biol* **11**: 285-337,1989

- 26.-** Jesee S, Howard SS: Survey of the sperm, sodium, and potassium concentrations in the epididymis of the hamster. *Biol Reprod* **15**: 626, 1976
- 27.-** Maneely R.B: Epididymal structure and function: A historical and critical review. *Act Zool* **40**: 1- 10, 1959
- 28.-** Formes MW, De Rosas JC: Changes in the rat sperm head during epididymal transit. *Gamete Res* **24**: 453-459, 1989
- 29.-** Yanagimachi R: Mammalian fertilization in: *The Physiology of Reproduction*. Second edition. Knobil E Neill JD (Eds.) Raven Press Ltd. New York. pp189-317. 1994
- 30.-** Chang MC: A detrimental effect of rabbit seminal plasma on the fertilizing capacity sperm. *Nature*. **179**: 258-259, 1957
- 31.-** Reyes A, Oliphant G, Brakett BG: Partial purification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma. *Fertil Steril* **26**: 148-157, 1975
- 32.-** Brian KD: Inhibition of fertilizing capacity in mammalian spermatozoa by natural and synthetic vesicles. *Symposium on the Pharmacological effects of lipids, AOCS monograph No 5*: 145-158, 1978
- 33.-** Suarez SS, Wolf DP, Meizel S: Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluids. *Gamete Research* **14**: 107-121, 1986

- 34.-** Chavarría ME, Reyes A, Huacuja L, and Rosado A: Capacitation and acrosome reaction of human spermatozoa. An Assisted Reproduction Approach. Arch Med Res **23**: 83-91, 1992
- 35.-** Bedford JM: Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in cutherian mammals. Biology of Reproduction **28**: 108-120, 1983
- 36.-** Yanagimachi R: Mammalian fertilization in: the Physiology of Reproduction. Knobil E and Neil J. (Eds.) New York: Raven Press 135, 1988
- 37.-** Robertson L, Wolf DP, Tash JS: Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hiperactivated a human sperm. Biol Reprod **39**: 707, 1988
- 38.-** Morales P, Overstreet JW, Katz DF: Changes in human sperm motion during capacitation "in vitro". J Reprod Fertil **83**:119,1988
- 39.-** White DR, Aitken JR: Relation ships between calcium, cyclic- AMP, ATP, and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hiperactivating motility. Gamete Rep **22**: 163, 1989
- 40.-** Reyes A, Luna M, Chavarría ME: Determinación de la actividad de adenil ciclasa en el acrosoma del espermatozoide de cobayo. Arch Invest Méd (Méx.) **19**: 265, 1988
- 41.-** Reyes A, Delgado NM, Chavarría M E, Rosado A. Algunos conceptos nuevos sobre el mecanismo terminal de la fertilización en los mamíferos. Ginec Obstet Méx **58**: 292, 1990

- 42.-** Huacuja L, Delgado N M, Merchant H, Pancardo RM, Rosado A: Cyclic AMP. Induced incorporation of "pi" into human sperm membrane components. *Biol Reprod* **17**: 89, 1977
- 43.-** Reyes A, Chavarría ME, Rosado A: Interference with spermatozoa capacitation in: Regulation of male fertility. Cunninham G.R. , Sehill W.B., Hafez ESE, (eds.) The hauge: Martinus Nijhoff Pub. 135, 1980
- 44.-** Reyes A, Oliphant G, Brackett BG: Partial purification and identification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma. *Fertil Steril* **26**: 148-156, 1975
- 45.-** Rosado A, Velázquez A, Lara-Ricalde R: Cell polarographic II. Effect of neuraminidase and follicular fluid upon the surface characteristics of human spermatozoa. *Fertil Steril* **24**: 349-357, 1973
- 46.-** Cross NL, Overstreet JW: Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation "in vitro". *Gamete. Res.* **16**: 23-29, 1987
- 47.-** Villarroya S, Scholler R Lateral diffusion of a human sperm- head antigen during incubation in a capacitating medium and induction of the acrosome reaction "in vitro". *J Reprod Fertil* **80**: 545-553, 1987
- 48.-** Rosado A: Aspectos nuevos de viejas ideas sobre la capacitación y la reacción acrosomal. *Arch Invest Med* **19**: 253-261, 1988
- 49.-** Delgado NM, Huacuja L, Pancardo RM: Changes in the protein conformation of human spermatozoa membranes after treatment with cyclic

adenosine 3 - 5 monophosphate and human follicular fluid. *Fertil Steril* **27**: 413-420, 1976

**50.-** Huacuja L, Sosa A, Delgado NM, Rosado A: Study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism. *Life Sciences* **13**: 1383-1394, 1973

**51.-** Delgado NM, Huacuja L, Pancardo RM and Rosado A: Selective utilization of endogenous phospholipids by zinc- depleted human spermatozoa. *Recent Advances in Human Reproduction. Proceedings of the first International Congress on Human Reproduction. Excerpta Medic, Amsterdam (ISBN9021903024). pp. 325-328, 1974*

**52.-** García R, Martínez R, Rabago M, Hernández-Pérez O, Reyes A. Subcelular distribution of phospholipase A2 and ATP-asas during capacitation and acrosome reaction in guinea-pig spermatozoa. *Arch Androl* **26**: 93, 1991

**53.-** Meizel S: Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface. *Ann J Anat* **174**: 285-293, 1985

**54.-** Langlais J, Robert's KD: A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research* **12**: 183-224, 1985

**55.-** Xolocotzi HE: El concepto de la etnobotánica. Colegio de posgrados Chapingo México. En: *Plantas medicinales de México. Departamento de Fitoleemia.*

Unidad de estudios etnobotánicos. Univ. Aut. De Chapingo. 29-34, 1989

- 56.-** Edmund W, Kaerine S, Wilson S: La ciencia de las plantas y su historia. En botánica a principios y problemas (eds.) P. Edmund, W. Willson, S. Editorial CECSA 2da. Edición. pp. 25-32, México. 1981
- 57.-** Fray Juan Navarro. Historia Natural o Jardín Americano (manuscrito 1801). Primera edición Univesidad Nacional Autónoma de México. Instituto Mexicano del Seguro Social, Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los trabajadores del Estado, 71-125, 1994
- 58.-** Lozoya X. Medicina Tradicional Vol. III. En editorial comité editorial. ISBN 0185-2965. 1982
- 59.-** Capasso F, Balestrieri B, Mocolo N: Actualidad de las plantas medicinales. En Medicina Tradicional III (10); (comité editorial). Xavier Lozoya, Carlos Zalla y Alma Gómez; 4ta. Edición, 53-61, 1980 México.
- 60.-** Jordá, J.R.: Métodos anticonceptivos en: Anticoncepción. Trias de Bes S.D., Turro, E.F., Barri Reur, P.N., Buxaderas, R., Padró, R.T., Salvat Editores S.A. and Edición Barcelona, España.15: 26, 1979
- 61.-** Hafez, E.S.E. Male contraception in: Human Reproduction. Contraception and Contraception: Edited by Hafez E.S.E. harper & Raw. Publisher. 2da. Edition. I. Univ Wayne, Detro. Michigan, 843-853, 1959
- 62.-** Berstein, G.S.: Clinical effectiveness of and aerosol contraceptive from Contraception **3**: 37-42, 1971
- 63.-** Huggings, G., Vassej, M., Flavel, R., Yeates, D., Mepherston, K.: Vaginal spermicides and outcome of pregnancy, Findings in alarge cohort study. Contraception. **24**: 219-225, 1982

- 64.-** Johnson, A.B. Maness, R.F., Wheles, R.G.: Calcareous deposits formed on IUDs in human esposures. *Contraception*. **14**: 507-517, 1976
- 65.-** Timomen H.: Copper release from coppe. T. Intrauterin devices. *Contraception*. **14**: 1-12, 1976
- 66.-** Edgren, R.A., Surtevant, F.M.: Potencies of oral contraception, Am., J. Obstet and gynecol **125**: 1029-1033, 1976
- 67.-** Koetsawan, S.: Injected long- acting medroxiprogesterone acetate effect on human lactation and concentration in milk. *J. Med. Asooc. Thai*. **60**: 57-60: 1977
- 68.-** Vassey, M. Moislser, L., Flavey, Yentes, D. Outcome of pregnancy in women using methods of contraception. *Br. J. Obstet. Ginecol*. **96**: 548-556:1979
- 69.-** Pardananani, D.S., Patil, N.G., Pawar, H.N.: Some gross observations of the epididymis following vasectomy. *A clinical study fertil steril*. **27**: 267-272, 1976
- 70.-** Vessey M., Meisler L., Flavel R., Yeaates D. Outcome of pregnancy in women using different methods of contraception. *B.J. Obs. Gyn.*: **86**: 548-5561979
- 71.-** Omorain C, Smethutst P and Dore CJ: Reversible male infertility due to sulphasalazine studies in man and rat. *Gut* **25**: 1078 - 1084, 1984
- 72.-** Sharma RK, Ralla NR: Spermatozoa abnormalities and male infertility in the rat following sulfasalazine treatment. *Int. J Fertil* **39**: 347-354, 1994
- 73.-** Wong PYD, Lau SKD, Fu WO. Antifertility effects of some sulfonamides and related compounds and their accumulation in the epididymides of male rats. *J Reprod Fert*. **81**: 259-267, 1987

- 74.- Pholpramol C. Srikhao A. Antifertility effects of sulphasalazine in the male rat. *Contraception* **28**: 273-279, 1983
- 75.- Sharma RK, Ralla NR: Spermatozoa abnormalities and male infertility in the rat following sulfasalazine treatment. *Int. J Fertil* **39**: 347-354, 1994
- 76.- Gill - Sharma, Gopalkishnan N, Balasinor P: Effects of tamoxifen on the fertility of male rats. *J Reprod. Fert* **99**: 395 - 402, 1993
- 77.- Morris ID, Bardin CW, Musto NA, Thau R and Gunsalus GL: Androgen binding protein in serum testis and epididimys following treatment with the Leydig cell cytotoxic agent ethylene dimethane sulphonate. *International of Andrology* **11**: 153-163, 1988
- 78.- Galenus: Planificación Familiar para el año 2000: Vacuna anticonceptiva. Editor: Adrian Castillo Ortiz ,Año 11 No. 53, 1996
- 79.- Soufir JC, Jouannete P, Marson J and Soumah A: Reversible inhibition of sperm production and gonadotrophin secretion in men following combined oral medroxyprogesterone acetate and percutaneous testosterone treatment. *Act. Endocrinol* **102**: 625-632, 1983
- 80.- Merrigiola MC, Marcovina S, Paulsen CA, Bremner WJ: Testosterone enanthate at a dose of 200 mg/week decreased HDL-cholesterol levels in healthy men. *International Journal of Andrology* **18**: 237-242, 1995
- 81.- Wu FCW, Farley TMM, Peregoudov A, Waites GMH: the WHO task force on methods for the regulation of male fertility. Effects of testosterone enanthate in normal men: experience for a multicenter contraceptive efficacy study. *Fertil Steril* **65**: 626-36, 1996

- 82.- WHO, task force on methods for the regulation of male fertility: Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertility and Sterility* **65**: (4) 821-829, 1996
- 83.- Stolzenberg SJ, Parkhurst RM: Spermicidal actions of extracts and compounds from Phytolacca dodecandra. *Contraception* **10**:(2) 135-143, 1974
- 84.- Khol Rute SD: Effect of Hibiscus rose sinensis on spermatogenesis and accessory reproductive in rats. *Plant Med* **31**: 127-135, 1997
- 85.- Rujaseharan M, Nair AGR, Hellstrom WJG, Sicka SC: *Contraception* **47**: 401- 412, 1993
- 86.- Kamboj V F, Dhawan B N: Research on plants for fertility regulation in India. *Journal of ethnopharmacology* **6**: 191-226, 1982
- 87.- Trifunac NP, Bernstein GS, : Inhibition of the metabolism and motility of human spermatozoa by various alkaloids. *Contraception* **25**: (1) 69-87, 1982
- 88.- Soufir J C, Radiguez C, Dantec C, Garnier D and Jegou B: Gossypol-induced modifications in the microenvironment of rat epididymal spermatozoa. *J Reprod Fert* **86**: 427-434, 1989
- 89.- Meng GD, Zhu JC, Chen ZW, Wong LT, Zhang GY, Hu YZ, Ding JH, Wang X H, Qian SZ, Wang C, Manchin D, Pinol A and Waites GMH: Recovery of sperm production following the cessation of gossypol treatment: a two-center study in China. *International Journal of Andrology* **11**: 1-11, 1988
- 90.- Qian SZ, Zhong C Qi and YX.: Effect of tripterigium wilfordii Hook. F. on the fertility of rats. *Contraception* **33**:(2); 105-110, 1986.
- 91.- Quian SZ, Zhong CQ, Xu N, Xu Yu: Antifertility effect of Triptеригium wilfordii in men. *Contraception* **2**: 253-254, 1986.

- 92.-** Quian SZ: Tripterygium wilfordii. A chinese herb effective in male fertility regulation. *Contraception* **36**: (3), 335-345, 1987
- 93.-** Matling SA, Belenguer A, Stacey VF: Male infertility compounds from Tripterygium wilfordii (Hook E F). *Contraception* **47**: 337-400, 1993
- 94.-** Sakagami H, Kamazoe Y, Komatsu N: Antitumoral, antiviral antimmunopotential activities of pine cone extracts. *Anticancer Res* **11**: 881-888, 1991
- 95.-** Huacuja L, Taboada J, Ortega A, Merchant H, Delgado NM: Crassulaceae y Immobilization and agglutination effects of Echeveria gibbiflora aqueous crude extract on human spermatozoa. *Contr Deliv Syst* **2**: 229-236, 1985
- 96.-** Huacuja L, Puebla AM, Miranda ML, Carranco A, Gúzman A, Jiménez M, Reyes A: Immobilization, agglutination and structural effects produced by Kalanchoe blossfeldiana aqueous crude extract on human spermatozoa. *Assisted Reproductive Technology/Andrology* **8**: 33-42, 1995
- 97.-** Zuñiga G, Huacuja L, Carranco A, Merchant H, Gúzman A: Efecto del Sedum oxipetalum sobre la fisiología de los espermatozoides de humano y de ratón. *Boletín del Centro Médico Nacional de Occidente* **2**: 12-16, 1992
- 98.-** P. Font Quer. *Botánica Pintoresca*. Biblioteca Hispania Ilustrada Editorial Ramón Sopena, S.A. Barcelona. P 364-461, 1978
- 99.-** Fausta Mainardi. *Cactus y otras plantas crasas*. Editorial De Vecctii, S.A.. Barcelona 1978
- 100.-** Maurizio. Sajeva & Marianggla Costanzo. *Succulents. The Illustrated Dictionary*. Timber Press. Portland , Oregon. 1994

- 101.-** Leaflet No 8509. Care and culture of *Kalanchoe*. Joseph W. Love, extension horticultural specialist 1998 May. Available from: <http://www.ces.nlsu.edu/hil/hi/-8509, htm/>
- 102.-** Christopher Brickell VII. Enciclopedia Plantas y Flores. Grijalbo México 1989
- 103.-** Rodríguez L. y Azpezteguia R.- Cactus y otras suculentas en Cuba Editorial Científico Técnica. Ciudad de la Habana 1985
- 104.-** Salisbury, F.B. and C.W. Ross. Plant Physiol, 4<sup>th</sup>.de. Wadsworth Publishing Company, Belmont, California. 1992
- 105.-** Ehrlich, P.R. and Ceballos, G.: Población y medio ambiente: ¿que nos espera ? Ciencia. **48**: 4, 19-30, 1997.
- 106.-** Huacuja L , Puebla AM , Carranco A, Miranda ML , Merchant H, Reyes A, Gúzman A: Contraceptive effect on the male wistar rat oral administration of Kalanchoe blossfeldiana Crassulaceae plant aqueous crude extract. Adv, Cont. Deliv. System. **13**: 1997
- 107.-** Toullet F, Voisin GA: Spermatotoxic, sperm agglutinating and cytotoxic activities of guinea-pig autoantibodies to sperm autoantigen T. J Reprod Fertil **37**: 299-313, 1974
- 108.-** Folch JL, Sloans M. and Stanley GHA. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. Biol. Chem. **26**: 497-504; 1956
- 109.-** Bottoher CJF, Vant-Gent C: A rapid and sensitive sub-microphosphorous determination. Anal Clin act **24**: 203-204, 1961
- 110.-** Ferro PV, Ham AB: Rapid determination of total and free cholesterol in serum. Am J Clin Pathol **33**: 545-553, 1960

- 111.-** Lowry HO, Rosenbrough NO, Farr AL, Randal R J: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem **193**: 265-275, 1951
- 112.-** Hewitt BR: Spectrophotometric determination antrona of total carbohydrates. Nature **182**: 246-252, 1958
- 113.-** Sydow G: A simplified quick method for determination of sialic acid in serum. Biochim Biochem Act **44**: 1721-1723, 1985
- 114.-** Soufir JC, Marson J, Jouannet P: (L) carnitine in human seminal plasma. Int J Androl **4**: 388-393, 1981
- 115.-** Fornés MW., Barbieri A and Cavicchia CJ.: Morphological and enzymatic study of membrane-bound vesicles from the lumen of the rat epididymis. Andrology **27**: 1-5, 1995
- 116.-** Setchell BP and Hinton BT.: The effects on the spermatozoa of changes in the composition of luminal fluids as it pass along the epididymis. Prog. Reprod. Biol. **8**: 58-66, 1981
- 117.-** Levine N, Marsh DJ: Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferent in rat. J. Physiol (London) **13**: 557-570, 1971
- 118.-** Moore HMD, Bedford M: The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. Anat. Res. **193**: 313-328, 1979
- 119.-** Hinton BT and Hernández H. Selective absorption of L- carnitine from the proximal regions of the rat epididymis. Possible relationships to development of sperm motility. J of Androl **6**: 300- 305, 1985

- 120.-** Casillas ER: Accumulation of carnitine in bovine spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Biol Chem.* **248:** 8227-8232, 1973
- 121.-** Casillas ER, Chaipayungpan S : The distribution of carnation and acetylcarnitine in the rabbit epididymis and the carnitine content of rabbit spermatozoa during maturation. *J Reprod Fert* **56:** 439-444, 1979
- 122.-** Casillas ER, Villalobos P, González R: Distribution of carnitine and acetylcarnitine in the hamster epididymis and in epididymal spermatozoa during maturation. *J Reprod Fert* **72:** 197-201, 1984
- 123.-** Horan AH, Bedford JM: Development of the fertilizing ability of spermatozoa in the epididymis of the Syrian hamster. *J Reprod Fert.* **30:** 417-423, 1972
- 124.-** Carter AL, Stratman FW, Hutson SM, Lardy HA: the role of carnitine metabolism. In: *Carnitine Biosynthesis metabolism and functions.* Frenkel R.A., McGarry JD. (eds). Academic Press, New York. pp. 251-259, 1980
- 125.-** Aveldaño MI, Rotstein NP, Vermouth NT : Lipid remodeling during epididymal maturation of rat spermatozoa. *Biochem. J* **283:** 235-241, 1992
- 126.-** Nikolopaulov M, Soucek DA, Vary JC: Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. *B.B. Acta* **815:** 486-498, 1985
- 127.-** Yeagle PL: Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEF J.* **3:** 1833-1842, 1989
- 128.-** Gennis R.B: *Biomembranes: Molecular structure and function.* New York. Springer Verlag, 1989

- 129.-** Huacuja L, Delgado NM, Calzada L: Exchange of lipids between spermatozoa and seminal plasma in normal and pathological human semen. *Arch. Androl.* **7**: 343-349, 1981
- 130.-** Ulloa- Aguirre A: Building- Up Research in Reproductive Biology in México. *Arch Med Res* **26**: 5195-5202, 1995
- 131.-** Mercado E, Rosado A: Structural properties of the membrane of intact human spermatozoa. *Biochem Biophys Act* **298**: 639 - 652, 1973
- 132.-** Rosado A, Huacuja L, Delgado NM. Cyclic-AMP receptors in the human spermatozoa membrane. *Life Sciences* **13**: 1707-1714, 1975
- 133.-** Huacuja L, Sosa A, Delgado NM, Rosado A: A kinetic study of the participation of zinc in human spermatozoa metabolism. *Life Sciences* **13**: 1383 -1394, 1973
- 134.-** Huacuja L, Delgado NM, Merchant H, Pancardo RM, Rosado A: Cyclic-AMP induced incorporation of  $^{33}\text{P}_i$  zinc in human spermatozoa metabolism. *Biol Reprod.* **17**: 89-96, 1977
- 135.-** Delgado NM , Reyes , Huacuja L , Merchant, Rosado A: Heparin binding sites in human spermatozoa. *Arch Androl* **8**: 87-95 , 1987
- 136.-** Hicks JJ, Pedrón N, Rosado A: Modifications of human spermatozoa glycolysis by cyclic-adenosine monophosphate (cAMP), estrogens and follicular fluid. *Fertil Steril* **23**: 886- 893, 1972
- 137.-** Hicks JJ, Rojas L, Rosado A: Insulin regulation of spermatozoa metabolism. *Endocrinology* **92**: 833-842, 1973
- 138.-**Rudel HW, Martínez- Manatau J, Maques-Topete M: The role of progestagens in the hormonal control of fertility. *Fertil Steril* **16**: 158-165, 1965

- 139.-** Martínez-Manatou J, Giner-Velazqués J, Aznar R: Low doses of progestogen as an approach to infertility control. *Fertil Steril* **17**: 49-56, 1966
- 140.-** Martínez-Manatou J, Giner-Velazquez J, Cortés-Gallegos V: Daily progesterone for contraception: a clinical study. *Br Med J.* **2**: 730-738, 1967
- 141.-** Gual C, Becerra C, Rice-Wary E, Golzicher JW. Inhibition of ovulation by strogen. *Am J Obstet Gynecol* **97**: 443-449, 1967
- 142.-** Gual C, Kastin AJ, Schally AV: Clinical experience with hypothalamic releasing hormones. *Rec. Prog Horm Res* **28**: 173-180, 1971
- 143.-** Gual C : Clinical effects and uses of hypothalamic releasing and inhibiting factors. In: Ganon WF, Martini L. Eds.: *Frontiers in Neuroendocrinology* 89, 1973
- 144.-** Romo de Vivar A: *Productos narturales de la flora Mexicana*. Editorial limusa SA. de CV. 1ra edición, 1985