

Trabajo científico

Evaluación del efecto del extracto metanólico de *Tagetes lucida* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho *Wistar*

Evaluation of the effect of methanol extract of *Tagetes lucida* on testicular function and sperm quality in male *Wistar* rats

Miguel A. Téllez-López,^{1,3} Jaime Fco. Treviño-Neávez,³ Ma. Julia Verde-Star,³ Catalina Rivas-Morales,³ Azucena Oranday-Cárdenas,³ Javier Moran-Martínez,² Luis Benjamín Serrano-Gallardo,² Ma. Eufemia Morales-Rubio³

¹Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango

²Departamento de Biología Celular y Ultra-estructura, Centro de Investigación Biomédica de la Universidad Autónoma de Coahuila

³Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Resumen

Se evaluó la calidad espermática y testicular en ratas macho *Wistar* administradas con extracto metanólico de *Tagetes lucida*. Las ratas se dividieron en grupos control negativo, positivo y tratado. Se determinó la toxicidad del extracto con *Artemia salina* presentando una DL₅₀ de 454.03 µg/mL. El peso de los testículos, epidídimos y niveles de testosterona no mostraron diferencia significativa. Las variables espermáticas del grupo tratado disminuyeron significativamente con respecto al control, la morfología testicular evaluada en cortes histológicos mostraron vacuolización de los túbulos seminíferos. La genotoxicidad encontrada mediante el ensayo cometa sobre los espermatozoides mostró rupturas de simple cadena del ADN en diferentes niveles de migración de 170.8 UA. Se concluye que el extracto metanólico de *Tagetes lucida* disminuye la calidad espermática de la rata macho y afecta la estructura testicular.

Abstract

Sperm and testicular quality were determined in male *Wistar* rats administered with methanol extract of *Tagetes lucida*. The rats were divided into negative and positive control group and treated group. We determined the toxicity of the extract with *Artemia salina* showing an LD50 of 454.03 µg/mL. Testes and epididymis weight and testosterone levels showed no significant difference. The sperm variables treated group decreased significantly, testicular morphology in histological sections showed vacuolation of the seminiferous tubules. The genotoxicity found by comet assay on sperm showed single-stranded breaks in DNA in different migration levels of UA 170.8. It is concluded that the methanolic extract of *Tagetes lucida* reduces sperm quality and affects the male rat testicular structure.

Palabras clave: actividad anticonceptiva, *Tagetes lucida*, toxicidad, genotoxicidad.

Key words: contraceptive activity, *Tagetes lucida*, toxicity, genotoxicity.

Correspondencia:

MBC. Miguel Ángel Téllez López
Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León
Cerrada la Luz #45, Fraccionamiento Cerradas Quintas
Lerdo, C.P. 35158, Ciudad Lerdo, Durango.
e-mail: mtellez@ujed.mx

Fecha de recepción: 21 de mayo de 2013

Fecha de recepción de modificaciones:

18 de septiembre de 2013

Fecha de aceptación: 20 de enero de 2014

Introducción

El semen normal es una mezcla de espermatozoides suspendidos en las secreciones testiculares y epididimarias, que luego se combinan con las secreciones prostáticas, de las vesículas seminales y de las glándulas bulbouretrales. El análisis seminal por tanto permite dar información sobre la espermatogénesis y la condición fisiológica de los tejidos comprometidos.¹ En la década de los 50, MacLeod & Gold comenzaron a comparar los seminogramas de personas fértiles en pacientes con problemas para concebir un hijo, encontrando una estrecha relación entre la concentración espermática, la motilidad y su influencia en la capacidad fecundante de los varones en estudio.²

En los últimos años el análisis seminal continúa siendo una de las mejores herramientas en la investigación de la fertilidad masculina y la que brinda la mejor información previa para evaluar la calidad reproductiva de los varones,³ dentro del campo de la salud reproductiva, la infertilidad implica una deficiencia que no compromete la integridad física del individuo ni amenaza su vida.⁴

Se han llevado a cabo Investigaciones sobre el desarrollo de un anticonceptivo hormonal para los hombres, análogos a los estrógenos y las píldoras de progesterona utilizadas con tanto éxito por las mujeres debido a que los preservativos y la vasectomía tienen cada uno deficiencias.⁵

Para los países desarrollados y subdesarrollados el crecimiento de la población está afectando no solamente la economía sino también los aspectos sociales.^{6,7}

Actualmente muchos gobiernos y dependencias no gubernamentales se encuentran trabajando para controlar el crecimiento desmedido de la población. A pesar de esto, en los últimos años, la población está aumentando a un ritmo alarmante.⁷ La población mundial supera los 7 mil millones de habitantes y está aumentando en 80 millones al año. Organizaciones de Planificación familiar estiman que la mitad de todos los embarazos no son planeados y la mitad de los embarazos resultantes son no deseados.⁵ Esto último ocasiona aumento de las tasas de aborto, niños no deseados, incremento de la pobreza y abandono. Por consiguiente existe la necesidad de un mejor acceso a los anticonceptivos existentes, una mejor educación sexual y una mayor opción en la selección de anticonceptivos.^{5,8}

Los anticonceptivos ofrecen una forma eficaz de regular la fertilidad y proteger la salud, aunque el acceso de las parejas y los adolescentes a éstos puede verse limitado por factores como la falta de información y sus condiciones económicas.⁸

Una de las causas en el aumento de la población se debe a que la

mayoría de los anticonceptivos están disponibles sólo para las mujeres y las opciones para controlar la concepción en los hombres son limitadas, principalmente el uso del condón y la vasectomía.^{5,7,9}

Las plantas medicinales se han utilizado como medicina para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades desde tiempos antiguos. A pesar del gran avance observado en la medicina moderna en las últimas décadas, las plantas todavía hacen una importante contribución a la salud.¹⁰ En la actualidad muchos de los medicamentos empleados para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo el cáncer, son obtenidos de especies vegetales.¹¹

Históricamente desde el siglo XIX las plantas han contribuido en el desarrollo de los anticonceptivos orales femeninos, pero la búsqueda de nuevos anticonceptivos masculinos se encuentra en una etapa incipiente.⁶

La regulación de la fecundidad con plantas o preparados de plantas han sido reportadas en la literatura médica antigua de los pueblos indígenas. Un gran número de especies de plantas con efectos anticonceptivos han sido analizados en China y la India hace unos 50 años y se reforzaron posteriormente por los organismos nacionales e internacionales.¹²

En México son pocas las fuentes que reportan métodos anticonceptivos tradicionales, en razón de que existen grandes prejuicios, tanto religiosos como morales, así como temor a enfermedades de transmisión sexual y trastornos que pudieran sobrevenir por su uso. Sin embargo, determinantes de tipo económico son generalmente los que propician la necesidad de prevenir un nuevo embarazo.¹³

Tagetes lucida Cav., es una especie vegetal de la familia *Asteraceae*, conocida con el nombre común en Guatemala, Honduras, México, Costa Rica, entre otros países, como anisillo, pericón, hierbanís o hierba de San Juan.¹⁴

En medicina tradicional, *Tagetes lucida* se ha empleado en diversos problemas gastrointestinales, abortivo, inductor del parto, trastornos ginecológicos, dolores menstruales y enfermedades infecciosas.¹⁴⁻¹⁶ Sin embargo estudios sobre la fertilidad masculina en esta especie no se han reportado a la fecha, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar su actividad contraceptiva en ratas macho.

La composición química de *T. lucida* ha sido estudiada previamente, desde 1938, cuando se logró identificar el metil chavicol en alta concentración. Este mismo componente ha sido identificado por diferentes autores en *T. lucida*. En México a partir de un extracto metanólico de *T. lucida* se aislaron 4 compuestos cumarínicos. De la raíz se aislaron 3 bitelinos y un alfa-tertienil. Cuatro flavonoides glucosídicos fueron identificados de las partes aéreas, un trabajo realizado en Guatemala revela la presencia de un nuevo flavonoide glicosídico y dos nuevos ácidos fenólicos aislados de las hojas secas.¹⁷

Materiales y métodos

Material biológico

Vegetal

Las partes aéreas de plantas de *Tagetes lucida* fueron recolectadas en el poblado Yerbanís, ubicado en la región del semidesierto Chihuahuense, en el Estado de Durango, al Norte de México, localizado en las coordenadas: Latitud 24.9, Longitud -104.067 (API Google Maps).

Un ejemplar fue montado en prensa botánica y se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para su identificación, extendiéndose el Boucher # 009/2012.

Animales de experimentación

Las ratas macho Wistar fueron adquiridas en la empresa Harlam, Laboratories, SA de CV (México, DF) y fueron alojadas en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila. La edad de los animales fue seleccionada de acuerdo a los eventos de maduración en el ciclo reproductivo de la rata.¹⁸

Para cumplir con los lineamientos internacionales sobre el uso adecuado de los animales de experimentación, el protocolo de investigación fue sometido al comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila y aprobado de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999.¹⁹

Huevecillos de *Artemia salina*

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

Diseño experimental

Las ratas Wistar se mantuvieron bajo condiciones controladas de ciclos de 12/12 h luz/obscuridad, temperatura de 25 ± 3 °C, humedad relativa de 35-60 %, alimento para ratas Harlam 18 % de proteína y agua *ad libitum* hasta su maduración en el ciclo reproductivo y durante el experimento. Se formaron tres grupos al azar de cinco animales cada uno.

Grupo I (Grupo tratamiento): Se les administro 50 mg kg⁻¹ de extracto metanólico de *Tagetes lucida* diariamente suspendido en agua destilada por vía oral durante 45 días.

Grupo II (Grupo control positivo): Se les administró 50 mg kg⁻¹ de Undecanoato de testosterona diluido con aceite de oliva extra virgen estéril por vía intramuscular en dosis única.

Grupo III (Grupo control negativo) Se les administró un mL de agua destilada estéril (vehículo) diariamente por vía oral durante 45 días.

Obtención de extractos

El material vegetal se colocó en un desecador con aireación por un periodo de 5 días a 45 °C, una vez seco se molió en un molino mecánico (Wiley) obteniendo un polvo fino.²⁰

Para la obtención del extracto metanólico se pesaron en una balanza analítica (Ohaus) 30 g de material vegetal seco triturado y se adicionaron 300 mL de metanol (CTR Scientific) grado reactivo en un matraz Erlenmeyer, se tapó con papel parafilm y se agitó a baja velocidad en un agitador (Dual Action Shaker Lab-Line) y temperatura ambiente por 24 h, el macerado se filtró en papel filtro (Whatman International LTD. England) de poro grueso en matraz Kitazato con bomba de vacío (Auto Science), repitiendo el proceso tres veces utilizando la misma cantidad de solvente nuevo en cada ocasión. El filtrado del macerado se destiló en un Rotaevaporador (LEV211-V) para separar el solvente, el extracto crudo se llevó a sequedad completa en una estufa de aire caliente (Riossa) a temperatura menor a 50° C. Los extractos secos se almacenaron en refrigeración a 4° C en frasco ámbar hasta su utilización.^{20,21}

Análisis fitoquímico preliminar para identificación parcial de metabolitos secundarios

Para la determinación inicial de los principales principios activos presentes en los extractos metanólicos de *T. lucida*, se realizaron pruebas químicas de identificación. Las soluciones de los extractos se prepararon a una concentración de 50 mg/mL disueltos en metanol. Se utilizaron placas de cerámica de 12 pozos para las reacciones con el propósito de identificar esteroides, metilesteroides, flavonoides, saponinas, sesquiterpenlactonas, alcaloides, instauraciones, oxhidrilos fenólicos, grupo carbonilo y azúcares.²²

Toxicidad del extracto metanólico de *T. lucida* sobre *A. salina*

Se valoró la actividad tóxica del extracto metanólico de *Tagetes lucida* con nauplios de *Artemia salina* por el método descrito por Meyer y colaboradores (1982),²³ modificado por Molina-Salinas y Said-Fernández (2006).²⁴ Para la eclosión de los huevecillos de *A. salina*, se colocaron 40 g de sal de mar (Instant Ocean®, Acuarium System), 0.006 g de levadura de cerveza (Mead Johnson) en 700 mL de agua bidestilada y se aforó a un litro.

Se pesaron 0.1 g de huevecillos de *A. salina* (Brine Shrimp Eggs San Francisco Bay Brand INC) y se depositaron en un recipiente de vidrio de color negro dividido por una pared intermedia con un espacio en la parte baja de 2 mm, con 100 mL de agua de mar artificial, se mantuvieron en condiciones de oscuridad y oxigenación. Uno de los compartimentos se iluminó con una lámpara de 20 watts de luz blanca. Después de 48 h de incubación se tomaron 10 nauplios con micropipeta (LabMate Soft) para transferirlos a una microplaca de 96 pozos, se adicionaron 100 µL de la suspensión de nauplios/pozo más 100 µL de las diluciones de los extractos diluidos en agua de mar. Se utilizaron 50, 100, 250, 500 y 1000 µg/mL de extracto en cinco repeticiones. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio a concentración de 400 ppm²⁵ y agua de mar como

control negativo. Después de 24 h y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Labomed), se contaron los nauplios vivos y muertos por concentración, y se calculó la Dosis letal media (DL_{50}) del extracto utilizando el método estadístico Probit de Finney.²⁶

Evaluación de los niveles séricos de testosterona en ratas macho Wistar

Transcurridos los 45 días de administración oral del extracto y/o controles, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se extrajo 1 mL de sangre por punción cardíaca, se obtuvo el suero sanguíneo dejando coagular la muestra durante 2 h a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó por 20 min a 1000 rpm. Se removió el suero inmediatamente y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis.

La determinación de testosterona se llevó a cabo con la técnica de ELISA con kits comerciales (*NovaTein Biosciences*®) según el protocolo y la lectura de las absorbancias se realizó por medio de un lector de placas de ELISA modelo WH100.²⁷

Evaluación de los parámetros de la calidad espermática

Se obtuvo semen de los vasos deferentes y de la cola de los epidídimos, por medio de una incisión abdominal con la retracción del escroto, cortando el epidídimo en las ratas.

La región más caudal de los epidídimos y los conductos deferentes se colocaron en una placa de Petri con 2 mL de solución de NaCl al 0.9% a 4°C , con una aguja calibre 30 G se realizaron perforaciones para facilitar la dispersión del esperma. Se determinó la concentración espermática en cámara de Neubauer siguiendo el procedimiento utilizado para el conteo de glóbulos rojos, la cantidad de espermatozoides por macho se expresó en millones/mL de suspensión.

La morfología se evaluó en alícuotas de suspensión fijadas en formol y extendida en un portaobjetos, se tiñeron con eosina y se examinaron bajo microscopio óptico a 1000 aumentos. Por cada macho se analizaron 100 espermatozoides identificando normales y no normales.^{28, 29}

Las células consideradas morfológicamente anormales fueron aquellas que presentaron cabeza triangular, colapsada o en martillo, presencia de curvatura a nivel de la pieza intermedia, cola rectilínea o con curvatura (en distintos grados) tanto en la porción media como distal de la misma.³⁰

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

Electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa)

En las ratas macho en estudio se evaluaron 5×10^5 espermatozoides/mL ajustados y suspendidos en agarosa (CONDA®) de bajo punto de fusión al 0.5% en láminas portaobjetos pre-tratadas con 100 μL de agarosa de punto de fusión normal (CONDA®) al 0.5%, se incubaron 10 min a temperatura ambiente, los portaobjetos se colocaron en solución de lisis número 1 (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10% DMSO y 1% de Triton X 100) a un pH 10.0 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 4 h. Posteriormente, los portaobjetos se depositaron en solución de lisis número 2 (2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa K y 300 mM de DTT) con pH 7.4, a $37.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 18 h. Terminada la lisis número 2, se incubaron en tampón de electroforesis (NaOH 0.3 M, EDTA 200 mM) a pH 13.0 a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min en cuarto oscuro. Luego se realizó una corrida electroforética a 25 V y 100 mA/10 min. Se lavaron los portaobjetos con tampón neutralizante (0.4 M Tris-HCl; pH 7.5) y se deshidrataron con metanol puro. Una vez secas se sometieron a tinción con bromuro de etidio (SIGMA®) 35 μL a 4X, se observó en microscopio de fluorescencia (Labomed LX-400) a 40X.

Se analizaron 100 células por cada rata y se clasificaron por niveles de migración: ninguna, corta, media, larga y muy larga. A estos niveles se les asignaron valores numéricos (0, 1, 2, 3 y 4). Se analizan las unidades arbitrarias según Collins en el 2004.³¹

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

0TCG0= Total de células grado 0
1TCG1= Total de células grado 1
2TCG2= Total de células grado 2
3TCG3= Total de células grado 3
4TCG4= Total de células grado 4

Evaluación histológica de testículo de rata

Después del periodo de tratamiento de las ratas macho se tomaron muestras de testículo y se procesaron por la técnica convencional histológica hasta su inclusión en bloques de parafina. Posteriormente mediante microtomía se obtuvieron cortes histológicos de 5 μ de grosor que se tiñeron con Hematoxilina- Eosina (H y E) para su evaluación histológica general. Las muestras se analizaron a microscopía de luz.³²

Resultados y discusión

La especie vegetal seleccionada para este estudio fue elegida en base a estudios previos sobre la actividad biológica, aplicación etnofarmacológica y por su distribución en la Región de la Comarca Lagunera de Durango, al Norte de México. Se sabe que determinados rangos de temperatura e intensidad lumínica intervienen de manera directa en el comportamiento de estas plantas, tanto en su crecimiento y desarrollo, como en la biosíntesis de los principios activos.³³

Un ejemplar vegetal debidamente prensada fue entregada para su identificación al Herbario de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro el cual extendió el Boucher # 009/2012. El rendimiento de la extracción fue de 6.12 %. En las pruebas fitoquímicas realizadas al extracto metanólico de *T. lucida* se identificaron saponinas, flavonoides, esteroides, alcaloides y antocianinas, al respecto existen reportes de que *T. lucida* es una especie medicinal cuyo principal compuesto activo acumulado en las partes aéreas, es un aceite esencial constituido fundamentalmente por metilchavicol, se refiere que posee además 7 cumarinas y 3 flavonoides, en especial patuletina y constituyentes fenólicos,³³ así mismo se ha reportado la presencia de terpenoides en las hojas y tienilos en la raíz.³⁴ Estos resultados nos permiten corroborar que los compuestos presentes en *T. lucida*, pertenecen a los mismos grupos funcionales que previamente se han reportado en la literatura.

Por ser un método sencillo y económico para la búsqueda primaria de toxicidad en extractos crudos³⁵ se empleó el bioensayo de letalidad de *A. salina*, el extracto metanólico de *T. lucida* resultó activo, no toxico con una DL_{50} de 454.03 $\mu\text{g/mL}$. En otro estudio se reportó que el extracto hexánico de flor, hojas y raíz de esta especie, presentan una elevada toxicidad con el bioensayo de *A. salina* siendo la excepción el extracto metanólico el cual según los criterios de Meyer lo considera bioactivo.³⁶

Durante el periodo de acondicionamiento y tratamiento de las ratas se llevó a cabo el control de peso corporal de los animales en estudio (tabla 1), observando que los pesos corporales no mostraron alteración significativa durante la alimentación en el tratamiento, resultados similares pero con extracto de semilla de *Abrus precatorius* indican que el extracto no promueve el aumento de peso que causa la obesidad o retención de agua.¹⁰ En la tabla 2 se muestran los pesos y la longitud de los testículos y epidídimo al término del experimento; en la cual observamos diferencia entre los promedios de la longitud y peso de los testículos, así mismo no se encontró diferencia en los pesos de los epidídimos del grupo tratado con *T. lucida* y el grupo control. Estos resultados son diferentes a lo que se encontró con el extracto de semilla de *Madhuca latifolia* donde se reportó la disminución del tamaño de los testículos en ratas, en concordancia con la disminución en los niveles plasmáticos de testosterona⁶ observándose que en esta investigación los niveles de testosterona si se ven comprometidos. Otro estudio muestró que la administración del extracto de semilla de *Abrus precatorius* en ratones machos ocasionó una disminución significativa del peso del testículo y del epidídimo en ratones con respecto al control lo cual pudo ser atribuido a la pérdida de espermatozoides en los testículos,¹⁰ observándose en ésta investigación que la estructura testicular se ve afectada, más sin embargo los parámetros de peso y longitud del testículo no mostró diferencia significativa ni los pesos de los epidídimos.

En la tabla 3 se muestran los resultados de los niveles séricos de testosterona al término del tratamiento con el extracto metanólico de *T. lucida* así como los controles, con una diferencia estadística significativa entre las medias de los grupos evaluados ($p < 0.001$). El grupo tratado con el extracto metanólico de *T. lucida* presentó niveles de testosterona por debajo del grupo control negativo, así como del grupo control positivo (tratado con undecanoato de testosterona); en un estudio realizado en ratas albinas a las que se les administró extracto acuoso de *Madhuca latifolia* se presentó una disminución significativa de los niveles de testosterona en suero ocasionando disminución en el peso de testículos así como en la concentración espermática.⁶ Otras investigaciones nos indican que los niveles séricos de testosterona en ratas expuestas con extractos de *Abrus precatorius* registraron una reducción significativa, que es una causa probable de la función testicular y epididimal como resultado de una disminución de andrógenos.¹⁰ En otra investigación con extracto acuoso de hojas de *Aegle marmelos*, éste disminuyó los niveles de testosterona con respecto al grupo control.³⁷ Nuestros resultados son similares a los que se reportaron en esta investigación, sin embargo no se observó alteración en el peso y longitud de testículos, así mismo no se observó variación en el peso de los epidídimos.

Por otra parte la reducción significativa de testosterona en suero ocasionó la completa supresión de espermatozoides en ratas administradas con dienogestel más undecanoato de testosterona, contrario a lo que se ha descrito en seres humanos en los que a pesar del cese de la administración de testosterona intratesticular la espermatogénesis continúa, aunque a niveles marcadamente reducidos.³⁸

En la tabla 3, se muestran los resultados de la evaluación de la calidad espermática: concentración, motilidad, viabilidad espermática, así como el ensayo cometa donde se evaluó el daño en las cadenas de ADN del núcleo de los espermatozoides; parámetros andrológicos que son evaluados para determinar la fertilidad de un sujeto masculino.³⁹

En el grupo tratado con extracto metanólico de *T. lucida* disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la concentración, motilidad y viabilidad espermática respecto al grupo control negativo, así como la motilidad y viabilidad del grupo tratado con *T. lucida*, respecto al grupo control positivo mostró una disminución significativa ($p < 0.001$).

En otra investigación con ratas donde se administró extracto etanólico de *Lagenaria breviflora* presentaron anomalías en la morfología espermática pero la viabilidad de las células estaban dentro del rango que las ratas control, lo que demuestra que el extracto no afectó la viabilidad de espermatozoides pero causó la deformación de las células afectando su movilidad;³⁹ caso contrario a este estudio donde los parámetros de la concentración espermática, motilidad y viabilidad fueron afectados significativamente en comparación con el grupo control. Otro reporte con extracto etanólico al 50 % de la raíz de *Martynia annua* dio como resultado un nulo conteo de los espermatozoides testiculares y epididimales causando lesiones en los túbulos seminíferos relacionados con la dosis administrada.¹²

Tabla 1. Incremento de peso corporal con respecto a diferentes periodos de tiempo de las ratas macho Wistar

| | Periodo I | Periodo II | Periodo III | Periodo IV | Periodo V | Periodo VI | Periodo VII |
|--|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Grupo I <i>T. lucida</i> | 152.6±24.16 | 238±7.71 | 270.6±15.54 | 286.68±16.35 | 310.78±19.40 | 328±19.71 | 362.4±19.74 |
| Grupo II (Control positivo) | 170 ±18.16 | 246.4 ±16.25 | 280.6 ±23.83 | 295.24 ±25.3 | 318.34±29.13 | 331.4±34.39 | 360.84 ±39.9 |
| Grupo III (Control negativo) | 142.82±14.13 | 225.74±23.03 | 261.60±19.53 | 283.50±24.53 | 305.00±27.57 | 321.40±30.88 | 349.28±28.40 |

Los valores están representados en las medias de los g ± la Desviación Estándar por cinco animales (n=5) por grupo.

Cada periodo equivale a siete días excepto el periodo VII el cual es equivalente a tres días con un total de 45 días de exposición a controles y tratamiento.

No se encontró diferencia éntrelos tratamientos p<0.05

Tabla 2. Efecto del extracto metanólico de *T. lucida* en el peso y longitud testicular y peso de los epidídimos en ratas macho Wistar.

| | Peso Testículo I (g) | Peso Testículo II (g) | Longitud Testículo I (cm) | Longitud Testículo II (cm) | Peso Epidídimo I (g) | Peso Epidídimo II (g) |
|---|----------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------|
| Grupo I <i>Tagetes lucida</i> | 1.46±0.22 | 1.59±0.13 | 2.04±0.09 | 2.11±0.09 | 0.7812±0.06 | 0.7071±0.21 |
| Grupo II (Control positivo) | 1.53±0.12 | 1.55±0.14 | 1.99±0.15 | 1.97±0.12 | 0.7647±0.04 | 0.7657±0.04 |
| Grupo III (Control negativo) | 1.51±0.10 | 1.55±0.16 | 1.91±0.11 | 1.93±0.15 | 0.6967±0.06 | 0.6692±0.05 |

Los valores están representados en medias ± la Desviación Estándar por cinco animales (n=5) por grupo.

No se encontró diferencia éntre los tratamientos p<0.05

Tabla 3. Evaluación de los niveles séricos de Testosterona, densidad espermática, motilidad espermática, viabilidad espermática y ensayo cometa en ratas macho Wistar.

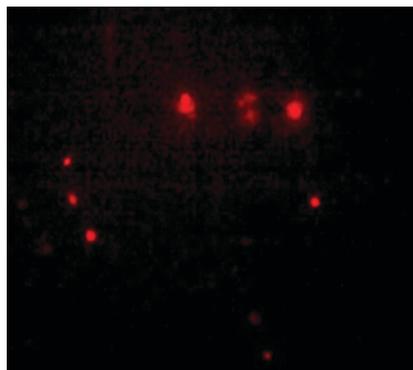
| | Testosterona ng/mL | Motilidad espermática % | Densidad espermática millones/mL | Viabilidad espermática % | Ensayo cometa UA |
|--|--------------------|-------------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------|
| Grupo I <i>T. lucida</i> | 0.596±0.179** | 65±7.68* | 15.80±4.26* | 63.40±8.59* | 170.80±18.32** |
| Grupo II (Control positivo) | 3.794±0.348** | 60.80±6.72** | 29.00±5.56 | 48.00±8.60** | 342.60±7.46** |
| Grupo III (Control negativo) | 3.014±0.143 | 78.20±2.58 | 28.20±9.44 | 75.60±5.81 | 0±0 |

Los valores están representados en medias ± la Desviación Estándar por cinco animales (n=5) por grupo. UA= Unidades Arbitrarias

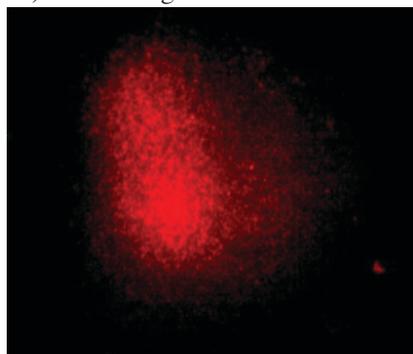
* p<0.05 = existe diferencia entre la comparación de medias del grupo control negativo con respecto a los demás grupo.

** p<0.001=existe diferencia significativa entre la comparación de medias del grupo control negativo con respecto a los demás grupo.

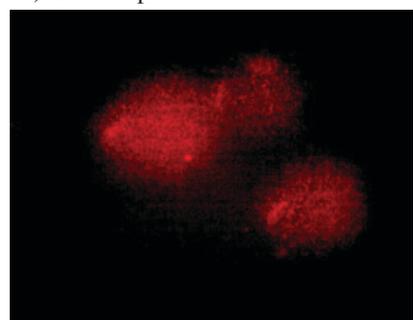
Los resultados en el ensayo cometa (figura 1) muestran que el ADN nuclear de los espermatozoides del grupo control positivo y el grupo tratado con el extracto metanólico de *T. lucida* mostraron alteraciones morfológicas a las dosis expuestas en los grupos experimentales.



a) Control negativo



b) Control positivo



c) *Tagetes lucida*

Figura 1. Fragmentación de ADN en células espermáticas de rata macho Wistar con administración oral de extracto metanólico de *Tagetes lucida* y controles.

a) Control negativo; núcleo de células espermáticas sin daño, se aprecia la integridad del material genético b) Control positivo; células con fragmentación de ADN grado IV c) Grupo administrado con el extracto metanólico de *Tagetes lucida*; se observa el ADN fragmentado, grado III, con frecuencia importante de rupturas de cadena sencilla en el ADN, se aprecia la dispersión del material genético de la célula.

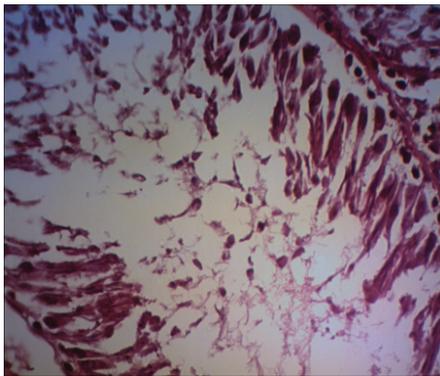
En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos del ensayo cometa, mostrando una diferencia significativa ($p < 0.001$) con respecto al tratamiento y el grupo control negativo. Con el ensayo cometa en el grupo tratado con el extracto de *T. lucida* de las células evaluadas por cada una de las unidades experimentales se observó que un 46.7 % de las células se observaron dentro del nivel de daño 2, lo que indica un daño moderadamente bajo, con frecuencia moderadamente alta de lesiones en el ADN.

En el grupo control negativo, el 100 % de las células se observaron en el nivel de daño 0; en el grupo control positivo el 61.4 % de las células se observaron en el nivel de daño 4 con células totalmente dañadas y cometas visibles. En otra investigación realizada en ratas *Sprague Dawley* donde se comparó la respuesta de ciclofosfamida (CF) y bleomicina (BL) se observó un efecto mutagénico de ambos compuestos, obteniéndose cabezas de espermatozoides anómalas con la CF en comparación con la BL, a la misma dosis, diseño y vía utilizada, observándose a la vez una disminución en la concentración espermática,⁴⁰ lo cual refleja resultados similares a esta investigación.

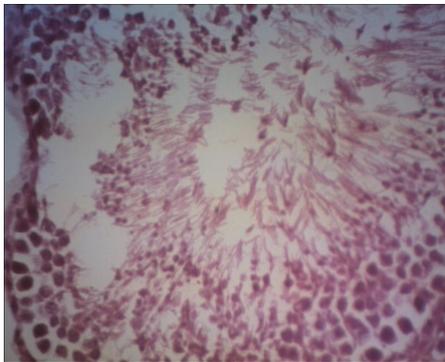
En otro trabajo realizado en ratas macho administradas con nanopartículas de plata de diferente tamaño y bajo diferentes tiempos de exposición reveló que estas causarían disminución en el conteo de espermatozoides, en paralelo aumentó los niveles de daños en células espermáticas evaluadas por electroforesis en gel de células individuales, la morfología espermática se vio comprometida⁴¹ observándose gran similitud en los resultados encontrados en nuestra investigación.

Con la administración oral de 50 mg/kg del extracto metanólico de *T. lucida*, se observó en el análisis morfológico de daño tisular *in vivo* sobre el testículo de ratas una vacuolización en la región de los túbulos seminíferos, observándose amplias zonas carentes de células y disminución espermática (figura 2a). En los cortes histológicos de los testículos del grupo control negativo se observó una elevada densidad de células espermáticas, límites celulares bien definidos y estructura de la apariencia histológica normal (figura 2 c); no hubo vacuolización.

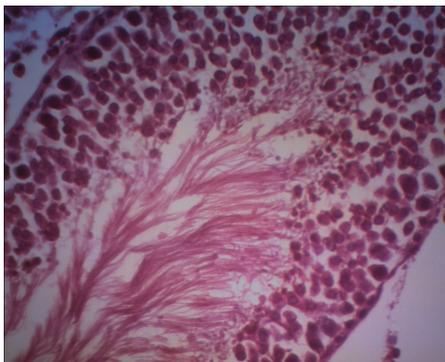
En el grupo control positivo, las ratas tratadas con undecanoato de testosterona, presentaron inhibición de la espermatogénesis, daño generalizado en el tejido testicular, presencia de abundantes vacuolas, signos de necrosis y alteración de la estructura testicular normal caracterizada por la desorganización y amplias zonas carentes de células (figura 2 b).



a) *Tagetes lucida*



b) Control positivo



c) Control negativo

Figura 2. Cortes histológicos de testículo de las ratas tratadas con el extracto metanólico de *Tagetes lucida* y controles.

a) Vacuolización en la región de los túbulos seminíferos, observándose amplias zonas carentes de células y disminución espermiática, b) Inhibición de la espermatogénesis, daño generalizado en el tejido testicular, presencia de abundantes vacuolas, signos de necrosis y alteración de la arquitectura espermiática normal caracterizada por la desorganización y amplias zonas carentes de células, c) Elevada densidad de células espermiáticas, no se observa vacuolización y se observaron límites celulares bien definidos y estructura de la apariencia histológica normal.

Conclusiones

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

Referencias

1. Aitken RJ. Whither must spermatozoa wander? The future of laboratory seminology. *Asian J Androl.* 2010; 12(1):99-103.
2. MacLeod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. VI. Semen quality and certain other factors in relation to ease of conception. *Fertil Steril.* 1953; (1):10-33.
3. Espinoza-Navarro O, Sarabia L. Evaluación y estandarización de la calidad del espermiograma: Nuevos límites inferiores de referencia. *Int J Morphol.* 2011; 29(3):885-890.
4. Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definición y causa de la infertilidad. *Rev Colomb Obstet Ginecol.* 2003; 54(4):227-248.
5. Amory JK, Page ST, Bremner WJ. Drug insight: recent advances in male hormonal contraception. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006; 2(1):32-41.
6. Gopalkrishnan B, Shimpi SN. Antifertility effect of *Madhuca latifolia* (ROXB.) macbride seed extract. *IJABPT.* 2011; 2(4):50-53.
7. Amory JK. Progress and prospects in male hormonal contraception. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008; 15(3):255-260.
8. Álvarez-Gómez AM, Cardona-Maya WD, Castro-Álvarez JF, Jiménez S, Cadavid A. Nuevas opciones en anticoncepción: posible uso espermicida de plantas colombianas. *Actas Urol Esp.* 2007; 31(4):372-381.
9. Bajaj VK, Gupta RS. Fertility suppression in male albino rats by administration of methanolic extract of *Opuntia dillenii*. *J Androl.* 2011; 44(1):1-8.
10. Bhatt N, Chaela SL, Rao MV. Contraceptive evaluation of seed extract of *Abrus precatorius* (L.) in male mice (*MUS MUSCULUS*). *J Herb Med Toxicol.* 2007; 1(1): 47-50.

11. Téllez-López MA, Ávalos-Soto J, Morán-Martínez J, Hernández-González S, Treviño-Neáñez JF, Verde-Star MJ, Serrano-Gallardo LB, Morales-Rubio ME. Evaluación de la Toxicidad del extracto etanólico de *Lippia graveolens* H.B.K. por ensayo de *Artemia salina* en microplaca. Rev Med de Torreón (México). 2011; 3(2):28-29.
12. Mali PC, Ansari AS, Chaturvedi M. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. J Ethnopharmacol. 2002; 82(2-3): 61-67.
13. Universidad Nacional Autónoma de México. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?1=&t=anticonceptivo&id=1611>. Acceso 21 de marzo de 2013.
14. Acosta de la LL, Hechevarría SI, Rodríguez FC. Estudios preliminares para el establecimiento del cultivo de *Tagetes lucida* Cav. Rev Cubana Plant Med. 2010; 15(1):38-45.
15. García-Sánchez F, López-Villafranco ME, Aguilar-Rodríguez S, Aguilar- Contreras A. Etnobotánica y morfo-anatomía comparada de tres especies de *Tagetes* que se utilizan en Nicolás Romero, Estado de México. Botanical Sciences. 2012; 90(3):221-232.
16. Universidad Nacional Autónoma de México. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=800> 2. Acceso 21 de marzo de 2013.
17. Visbal T, Rojas LB, Cordero de RY, Carmona AJ, Morillo M, Usabillaga A. Componentes volátiles de *Tagetes lucida* Cav. (Asteraceae) (Cordero Edo. Táchira. Venezuela). Rev Fac Farm (Venezuela). 2010; 52(1):2-4.
18. Sharp PE, LaRegina MC. The laboratory rat. CRS press LLC. 1998.
19. SAGARPA. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
20. Navarro GV, Rojas G, Zepeda GL, Avilés M, Fuentes M, Herrera AJE. Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. Pharm Biol. 2006; 44(4):297-300.
21. Nostro A, Germano MP, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. Lett Appl Microbiol. 2000; 30(5):379-384.
22. Harborne JB. Phytochemical Methods a guide to modern techniques of plant analysis. 3a Ed. Chapman & Hall, London. 1998, p. 1-32.
23. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. Plant Med. 1982; 45(19):31-34.
24. Molina-Salinas G, Fernández-Said S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). Pharmacologyonline. 2006; 3: 633-638.
25. Vega-Menchaca MC, Verde-Star J, Oranday-Cárdenas A, Morales-Rubio ME, Núñez-González A, Rivera-Guillen MA, Serrano-Gallardo LB, Rivas-Morales C. Actividad antibacteriana y citotóxica de *Leucophyllum fruscenscens* (Berl) I.M. Johnst del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. Rev Mex Cienc Farm. 2013; 44(2):24-30
26. Anderson JE, Goetz CM, McLaughlin JL, Suffness M. A blind comparison of simple bench-top bioassay and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. Phytochem Analysis. 1991; 2:107-111
27. NovaTein Biosciences. Rat Testosterone ELISA Kit. Catálogo NB-E30597
28. De la Cruz RWF, Luján MKM, Miranda SUE. Efectos del malathion sobre la espermatogénesis de ratones machos jóvenes de la cepa BALBC53. ECIPERU. 2004; 1(1):17-19.
29. Sobarzo C, Bustos-Obregon E. Acute effect of Parathion on the seminiferous epithelium of immature mice. Rev Chil Anat. 2000; 18(1):61-68.
30. Kawai Y, Hata T, Suzuki O, Matsuda J. The relationship between sperm morphology and in vitro fertilization ability in mice. J Reprod Dev. 2006; 52(4):561-568.
31. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol. 2004; 26(3):249-261.
32. Meena R, Misro MM, Ghosh D, Nandan D. Extended intervention time and evaluation of sperm suppression by dienogest plus testosterone undecanoate in male rat. Contraception. 2012; 85(1):113-121.
33. Acosta de la LL, Hechevarría S I, Rodríguez FC, Milanés FM. Momento óptimo de plantación y de cosecha en *Tagetes lucida* Cav. Rev Cubana Plant Med. 2011; 16(2):201-208.
34. Capunzo M, Bunetti L, Cavallo P, Boccia G, De Caro F, Ieluzzi. Antimicrobial activity of dry extracts of *Tagetes lucida* from Guatemala. JPMH. 2003; 44:85-87.
35. Meyer BN, Ferrigni NR, Putman JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Plant Med. 1982; 45:31-34.
36. Mejía-Barajas JA, Del Rio R, Martínez-Muñoz RE, Flores-García A, Martínez- Pacheco M. Cytotoxic activity in *Tagetes lucida* Cav. J Food Agric. 2012; 24(2):142-147.
37. Sathiyaraj K , Sivaraj A, Madhumitha G, Vinothkumar P, Saral AM, Devi K, Senthil KB. Antifertility effect of aqueous leaf extract of Eagle *marmelos* on male albino rats. IJCPR. 2010; 2(1):26-29.

38. Meena R, Mohan MM, Ghosh D, Nandan D. Complete sperm suppression induced by dienogest plus testosterone undecanoate is associated with down- regulation in the expression of upstream steroidogenic enzyme genes in rat testis. *Contraception*. 2012; 86(2):1-20.
39. Saba AB, Oridupa OA, Oyeyemi MO, Osanyigbe OD. Spermatozoa morphology and characteristics of male wistar rats administered with ethanolic extract of *Lagenaria Breviflora* Roberts. *Afr J Biotechnol*. 2009; 8(7):1170.
40. Arencibia AD, Rosario FL. Respuesta de ratones Balb/c frente a ciclofosfamida y bleomicina en el ensayo de la morfología de la cabeza del espermatozoide. *REDVET*. 2011; 12(2):1-11.
41. Gromadzka-Ostrowska J, Dziendzikowska K, Lankoff A, Dobrzyńska M, Instanes C, Brunborg G, Gajowik A, Radzikowska J, Wojewódzka M, Kruszewski M. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol Lett*. 2012; 15;214(3):251-258.