

Trabajo científico

Evaluación del efecto de las particiones del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho *Wistar*

Evaluation of the effect of *Opuntia ficus-indica* methanol extract partitions on sperm quality and testicular function in male Wistar rats

Miguel A. Téllez-López,^{1,3} Jaime Fco. Treviño-Neávez,³ Ma. Julia Verde-Star,³
Javier Moran-Martínez,² Nadia Deniss Betancourt,² Luis Benjamín Serrano-Gallardo,²
Ma. Eufemia Morales-Rubio³

¹Facultad de Ciencias Químicas, 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, Universidad Autónoma de Nuevo León

Resumen

Se evaluó la calidad espermática y testicular en ratas *Wistar*, tratadas con extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* y sus particiones clorofórmica, hexánica e insoluble en cloroformo. Las ratas se dividieron en 6 grupos: control negativo, positivo y 4 tratamientos. Los niveles de testosterona del grupo tratado con la partición clorofórmica mostró disminución significativa con respecto al control negativo. Las variables espermáticas de los grupos tratados disminuyeron significativamente comparado con los controles. La morfología testicular mostró alteraciones en los grupos tratados, acentuándose alteraciones de la morfología testicular en el soluble en cloroformo. El ensayo cometa mostró, rupturas de simple cadena del ADN en los grupos tratados, presentando mayor migración los extractos solubles en cloroformo y hexano. La partición soluble en cloroformo disminuye la calidad espermática de la rata afectando su estructura testicular.

Abstract

Testicular and sperm quality in Wistar rats treated with *Opuntia ficus-indica* methanol extract and its chloroformic, hexanic and cloroformic insoluble partition were evaluated. The rats were divided into 6 groups: negative, positive and treated control. Testosterone levels in the treated group with soluble in chloroform partition showed significant decrease compared to the negative control group. Sperm variables of the treated groups were significantly decreased compared to controls. The testicular morphology showed alterations in the treated groups, accentuating morphology alterations in soluble in chloroform. The comet assay showed single strand breaks in DNA in the treated groups, showing increased migration in soluble in chloroform and hexane extracts. Soluble in chloroform partition decreases sperm and testicular quality in rat affecting its structure.

Palabras clave: actividad anticonceptiva, *Opuntia ficus-indica*, genotoxicidad, toxicidad.

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

Correspondencia:

Dr. Miguel Ángel Téllez López
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Autónoma de Nuevo León
Av. Corregidora #340 Ote. Col. Centro, C.P. 27000
Torreón Coahuila
Tel. (81) 83-29-41-10, Ext 6468
e-mail: mtellez@ujed.mx

Fecha de recepción: 05 de agosto de 2014

Fecha de recepción de modificaciones:

16 de enero de 2015

Fecha de aceptación: 23 de enero de 2015

Introducción

Las plantas medicinales se han utilizado desde tiempos antiguos para el tratamiento de diversas enfermedades. A pesar del gran avance observado en la medicina moderna en las últimas décadas, las plantas todavía son una fuente importante en la contribución a la salud.¹ En la actualidad muchos de los medicamentos empleados para el tratamiento de diversas enfermedades incluyendo el cáncer, son obtenidos de prototipos aislados de especies vegetales.²

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.³

La regulación de la fecundidad con plantas o preparados de plantas han sido referidas en los manuscritos de la medicina tradicional 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 organismos nacionales e internacionales.⁴

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,⁵ 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.⁶ Dentro del campo de la salud reproductiva, la infertilidad implica una deficiencia que no compromete la integridad física del individuo ni amenaza su vida.⁷ Se han realizado investigaciones sobre el desarrollo de un anticonceptivo hormonal para 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.⁸

En reproducción humana, se presenta la oportunidad de buscar en la medicina tradicional y especialmente en plantas medicinales, nuevas alternativas de regulación de la fertilidad.⁹ *Opuntia ficus-indica* es una de las muchas especies conocida como nopal. Es una planta arbustiva de la familia de las cactáceas, como la mayoría de los miembros de este género carece de hojas, los segmentos o cladodios en que se divide, son tallos capaces de ramificarse, emitiendo flores y frutos.

Dentro de sus actividades biológicas, *Opuntia ficus-indica* se ha utilizado para el tratamiento de la obesidad, ya que las fibras insolubles que contiene, crean una sensación de saciedad, haciendo que disminuya el hambre de las personas y ayudan a una buena digestión, así mismo, las proteínas vegetales promue-

ven la movilización de líquidos en el torrente sanguíneo, disminuye la celulitis y la retención de líquido.¹⁰ Otra aplicación reportada es contra la diabetes e hiperglucemia incrementando los niveles y la sensibilidad a la insulina logrando con esto estabilizar y regular el nivel de glucosa en la sangre.¹¹ En personas con colesterol elevado se ha demostrado que el consumo de nopal, ayuda a eliminarlo evitando que se absorba gran parte de éste y así no se acumula en venas y arterias. Contiene antibióticos naturales, esta propiedad está relacionada con el metabolismo del ácido crasuláceo de las plantas, el cual, en las cactáceas inhibe el crecimiento de varias especies bacterianas. De ahí que tanto el consumo del nopal como la aplicación de cataplasmas de pencas de nopal tengan efectos benéficos en heridas e infecciones de la piel. También se ha reportado el uso de esta planta contra el cáncer,¹⁰ desórdenes gastrointestinales y digestión y como abortivo.¹²

Sin embargo estudios sobre la fertilidad masculina en esta especie no se han reportado a la fecha o no han trascendido en la literatura científica.

En estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se encontró que entre el 45 y el 71 por ciento de los hombres aceptarían usar un anticonceptivo masculino seguro, reversible, conveniente y sin cirugía, que se podría utilizar por separado de las relaciones sexuales,¹ por tal motivo y con el interés de profundizar en el conocimiento del empleo de plantas con propiedades biológicas, se evaluó la actividad de *Opuntia ficus-indica* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho Wistar.

Material y método

Material biológico

Vegetal

Las partes aéreas de *Opuntia ficus-indica* se recolectaron dentro de las instalaciones de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas en Bermejillo, Durango ubicada en la Latitud 25.894259°, Longitud 103.602911° (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 autenticación, quedó registrado con el Boucher # 009/2012.

Animales de experimentación

Las ratas macho Wistar fueron adquiridas en la empresa Harlam, Laboratories, SA de CV (México, DF) y mantenidas 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.¹³ Para cumplir con los lineamientos internacionales sobre el uso adecuado de los animales de experimentación y cumplir con la NOM-062-ZOO-1999¹⁴ el

protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Coahuila.

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.¹⁵

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.^{15,16}

Diseño experimental

Las ratas Wistar se mantuvieron bajo condiciones controladas de ciclos de 12/12 h luz/obscuridad, temperatura de 22 ± 2 °C, humedad relativa de 35-60 %, alimento para ratas Harlam® con 18 % de proteína y con acceso de agua ad libitum hasta su maduración en el ciclo reproductivo y durante el experimento. Se formaron seis grupos al azar de seis animales cada uno. Los extractos se diluyeron en agua destilada y fueron administrados diariamente vida oral, por 45 d en los grupos 1, 2, 3 y 4, al grupo cinco se le administró undecanoato de testosterona (dosis única) y al seis agua estéril vía oral por 45 d. Al grupo 1 (extracto metanólico crudo de *Opuntia ficus-indica*), se les suministró 50 mg/kg.

Al grupo 2 (partición insoluble en cloroformo del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*), se les administró 48.4 mg/kg. Al grupo 3 (partición soluble en hexano del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*), se les administró 1.345 mg/kg. Al grupo 4 (partición soluble en cloroformo del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*), se les administró 0.2515 mg/kg. Al grupo 5 (grupo control positivo), se les administró 50 mg/kg de Undecanoato de testosterona diluido con aceite de oliva extra virgen estéril por vía intramuscular en dosis única. Al grupo 6 (grupo control negativo), se les administró 1 mL de agua destilada estéril (vehículo) diariamente por vía oral durante 45 d.

Obtención de las particiones a partir del extracto metanólico crudo

El extracto metanólico crudo de *Opuntia ficus-indica* se sometió a calentamiento en un vaso de precipitado con 50 mL de hexano, agitándolo constantemente hasta el punto de ebullición durante 5 min, posterior al calentamiento se filtró la porción soluble en hexano y a la parte insoluble en hexano se le volvió a adicionar solvente volviendo a repetir el paso anterior hasta obtener un líquido claro, el filtrado se llevó a concentración con el rota-evaporador.

Una vez que se obtuvo el mayor contenido de compuestos solubles en hexano, a la parte que no se solubilizó con hexano se le adicionarán 50 mL de cloroformo repitiendo el mismo procedimiento que con el hexano, obteniendo de esta manera las particiones soluble en hexano, soluble en cloroformo e insoluble en cloroformo

Toxicidad del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* sobre *A. salina*

Se valoró la actividad tóxica del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* con nauplios de *Artemia salina* por el método descrito por Meyer y colaboradores (1982),¹⁷ modificado por Molina-Salinas y Said-Fernández (2006).¹⁸

Se utilizaron cinco concentraciones (50-1000 µg/mL) de extracto con cinco repeticiones. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio a concentración de 400 ppm¹⁹ y agua de mar como control negativo. Después de 24 h y con la ayuda de un microscopio estereoscópico (Labomed®), se contaron los nauplios vivos y muertos por concentración, y se calculó la dosis letal media (DL₅₀) del extracto utilizando el método estadístico Probit de Finney.²⁰

Evaluación de los niveles séricos de testosterona en ratas macho Wistar

Transcurridos los 45 días de administración oral del extracto y controles, se sacrificaron los animales por dislocación cervical. Se extrajo 1 mL de sangre por punción cardiaca, 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 y se almacenó a -20 °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 se obtuvo la lectura de las absorbancias con un lector de placas de ELISA modelo WH100.²¹

Evaluación de los parámetros de la calidad espermática

Posterior a una incisión abdominal de las ratas se obtuvo semen de los vasos deferentes y de la parte terminal de los epidídimos con la retracción del escroto, cortando el epidídimo. 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.^{22,23}

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.²⁴

Los parámetros de motilidad de los espermatozoides se valoraron a partir del semen obtenido de las ratas conteniendo 1mL de medio Holding Plus (Bioniche, Pullman®, WA, USA). Las placas Petri 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)

El ensayo cometa es una técnica en microgeles que involucra la electroforesis alcalina (pH 13) para detectar el daño al DNA en células individuales; se refiere a la migración del DNA en una matriz de agarosa bajo condiciones de electroforesis, que al ser observada la célula al microscopio, por fluorescencia o tinción con plata, presenta la apariencia de un cometa, con una cabeza, región nuclear, y cola, formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección del ánodo, por lo que es conocido como Ensayo Cometa, debido al patrón de migración del DNA que se produce. 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 °C durante 4 h. Posteriormente los portaobjetos se depositaron en solución de lisis número 2 (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂ EDTA, 10 mM Tris, 200 µg/mL de proteinasa K y 300 mM de DTT) con pH 7.4, a 37.5 °C durante 18 h. Terminada la lisis número 2, se incubaron en tampón de electroforesis (NaOH 0.3 M, EDTA 200 mM) a pH 13.0 a 4 °C durante 10 min en cuarto oscuro. Luego se realizó una corrida electroforética a 25 V y 100 mA/10 min. Se lavaron los portaobjetos con tampón neutralizante (0.4 M Tris-HCl; pH 7.5) y se deshidrataron con metanol puro.

Una vez secas se sometieron a tinción con bromuro de etidio (SIGMA®) 35µL a 4X, se observó en microscopio de fluorescencia (Labomed® LX-400) a 40X.

Se midió la longitud de la migración de 100 células por cada rata por medio del Software Comet Assay IV®.

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. Se obtuvieron en microtomo cortes histológicos de 5 µm de grosor que se tiñeron con Hematoxilina- Eosina (H y E) para su evaluación histológica general. Las muestras se analizaron con microscopio de luz.²⁶

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.²⁷

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. Los rendimientos del extracto metanólico crudo de *Opuntia ficus-indica* y sus particiones se muestran en la tabla 1, Barbosa y colaboradores en 2009,²⁸ realizaron particiones de un extracto crudo hidroalcohólico de *Ruta chalepensis*, el cual fue administrado en relación al porcentaje de rendimiento obtenido en cada partición con respecto al extracto crudo, al igual que en esta investigación, la partición que obtuvo menor rendimiento, fue la partición con menor polaridad y el solvente con mayor polaridad fue el que mostró mayor rendimiento, esto debido a que los extractos crudos fueron probados con solventes de alta polaridad.

Tabla 1. Rendimiento del extracto metanólico crudo y sus particiones de *Opuntia ficus-indica*

Partición	% Rendimiento
Extracto metanólico	6.12
Insoluble en cloroformo	96.8
Soluble en hexano	2.69
Soluble en cloroformo	0.503

%= porcentaje

Con respecto al ensayo de letalidad sobre *A. salina*, los valores obtenidos de la DL₅₀ para todos los extractos fueron superiores a 1,000 µg/mL, la técnica empleada ha sido ampliamente utilizada para seleccionar extractos crudos con posible actividad biológica ya que el crustáceo es sensible a un amplio rango de compuestos.^{17,31,32,33,34,35,36} Se ha determinado que este ensayo tiene una posible correlación con la pruebas específicas de toxicidad,³⁷ lo cual indica que el extracto no es tóxico según el criterio de Lagarto-Parra y colaboradores, (2001)³⁸ y según la escala de Déciga-Campos (2010).³⁹ Considerando estos criterios se puede establecer un futuro prometedor de *Opuntia ficus-indica*, ya que demostró actividad biológica contra la calidad espermática y menor toxicidad contra los nauplios de *A. salina* y ha sido empleado como alimento desde tiempos ancestrales hasta la actualidad sin presentar reportes de toxicidad.

Durante el estudio se midió el comportamiento del peso corporal de las ratas tratadas y controles (tabla 2) en intervalos de tiempo de 1 semana cada medición, observándose que en los grupos administrados con el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* y la partición insoluble en cloroformo con respecto al control negativo, mostraron una disminución en la tendencia del incremento de peso corporal. Grube y colaboradores en 2013, reportan el efecto sobre la disminución de peso corporal en pacientes administrados con una fibra aislada de *Opuntia ficus-indica* sin reportar efectos secundarios en los pacientes,⁴⁰ de la misma forma pero en un experimento en ratas Ennouri y colaboradores en 2006, observaron la disminución de colesterol, proteínas de baja densidad y disminución de peso corporal, sin reportar alteraciones en el estado de salud de los animales de experimentación,⁴¹ ambas investigaciones mantienen una relación estrecha con estos grupos ya que aparentemente no se ve comprometida la salud de las unidades experimentales con la administración de *Opuntia ficus-indica*.

En la tabla 3 se muestran los pesos y la longitud de los testículos tomados de las ratas al término del experimento; en la cual observamos diferencia entre los promedios de la longitud y peso de los testículos, en el grupo 4 se observa un aumento en el crecimiento de los testículos con respecto a los grupos control, en el grupo 1,2 y 3 existe una disminución en la longitud y peso de los testículos con respecto al grupo control, es de destacar que en el grupo 1 se observa una relación estrecha entre la disminución de los niveles de testosterona y el tamaño y peso de los testículos, estos resultados son similares a los 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 testosterona.³ Otro estudio mostró 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,¹ observándose en ésta investigación que la estructura testicular se ve afectada, al igual que los parámetros de peso y longitud del testículo.

Tabla 2. Peso corporal promedio de los animales en estudio en diversos intervalos de tiempo

Grupo	Periodo de tiempo						
	1	2	3	4	5	6	7
I. Extracto metanólico	239	245	252	260	266	277	285
II. Insoluble en cloroformo	171	173	229	241.7	252	264	275
III.Soluble en hexano	174.4	199	208	229	239	246	260
IV.Soluble cloroformo	181.1	232.6	264.6	280.2	298.5	309.2	336.4
V. Control negativo	142.8	225.7	261.6	283.5	305.0	321.4	349.2
VI.Control positivo	170.0	246.4	280.6	295.2	318.34	331.4	360.8

Los valores están representados en las medias de los gramos por seis animales (n=6) por grupo.

Cada periodo equivale a siete días con un total de 45 días de exposición a controles y tratamiento.

Se encontró diferencia entre los tratamientos p<0.05 con respecto al control negativo, excepto en el grupo soluble en cloroformo

Tabla 3. Niveles séricos de Testosterona, longitud y peso de testículos de ratas tratadas y controles

Grupo	Peso Testículo I	Peso Testículo II	Longitud Testículo I	Longitud Testículo II	Testosterona
	g	g	cm	cm	ng/mL
I. Extracto metanólico	1.147	1.127	1.79	1.80	1.133
II. Insoluble en cloroformo	1.08	1.06	1.79	1.80	4.29
III.Soluble en hexano	1.17	1.17	1.77	1.76	3.72
IV.Soluble cloroformo	1.55	1.56	2.12	2.10	1.94
V. Control negativo	1.53	1.55	1.99	1.97	3.012
VI.Control positivo	1.51	1.55	1.91	1.93	3.79

Los valores están representados en medias por seis animales (n=6) por grupo.

Se encontró diferencia entre los tratamientos p<0.05

g= gramos; cm= centímetros; ng/mL= nanogramos por mililitro

En los grupos 2 y 3 se observa un aumento en los niveles de testosterona con respecto al grupo control negativo y la longitud y peso de los testículos se ve disminuido, existe evidencia de

que altos niveles de testosterona en el cuerpo pueden ocasionar encogimiento de los testículos.

En la tabla 4, 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,⁴⁰ observándose en el grupo administrado con el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* una disminución marcada en la concentración, motilidad y viabilidad espermática así como un aumento en los niveles de migración de las cadenas de ADN de los espermatozoides, existiendo una diferencia significativa con respecto al control negativo. Este grupo presentó una concentración espermática de 10.8 millones de espermatozoides por mL y el grupo control negativo 28.20 millones de espermatozoides por mL, solo el 31.8 % de estas células se encontraban vivas, en cuanto al control negativo el 75 % de las células presentaron vida, la motilidad o movimiento progresivo que presentó el grupo 1 fue de 28.6 % y el control negativo presento un movimiento progresivo de 78.20 %, al evaluar por medio del ensayo cometa las células individuales del grupo administrado con el extracto metanólico de *Opuntia*, observamos que el promedio de la longitud de migración de este grupo fue de 13521 μm , en la figura 1 se muestran las imágenes de las células individuales espermáticas de los grupos control y tratados, imágenes de las cuales se obtuvo la distancia de migración que se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Evaluación de parámetros de calidad espermática: concentración, motilidad, viabilidad espermática y nivel de daño en las cadenas de ADN del núcleo de los espermatozoides

Grupo	Motilidad espermática %	Densidad espermática millones/mL	Viabilidad espermática %	Migración de ADN μm
I. Extracto metanólico	28.6	10.8	31.8	13521
II. Insoluble en cloroformo	52.83	11.13	53.16	1373
III. Soluble en hexano	56.6	19.06	58.83	7688
IV. Soluble cloroformo	37.33	27.28	39.83	13221
V. Control negativo	78.20	28.20	75.60	1202
VI. Control positivo	60.80	29.00	48	7711

%= por ciento; millones/mL= millones por mililitro; μm = micrómetros

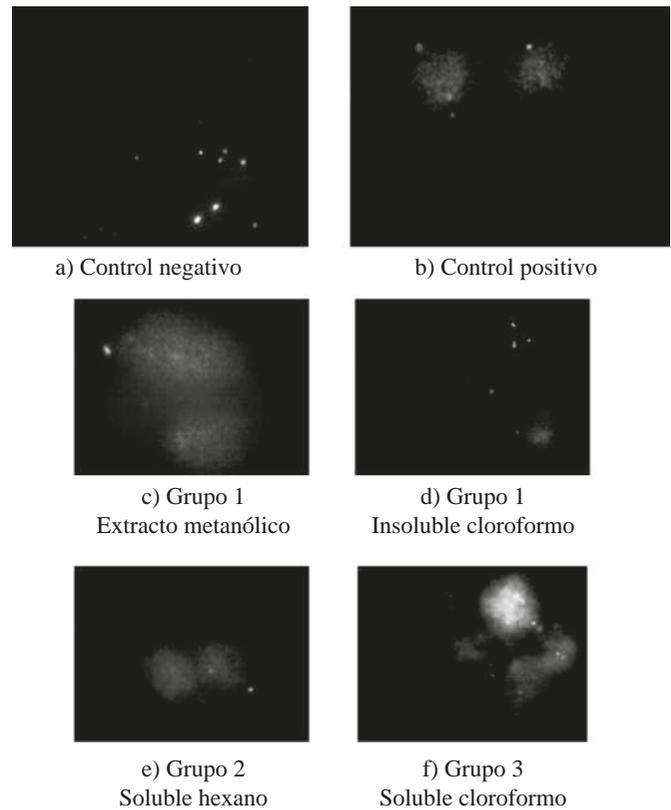


Figura 1. Ensayo cometa, fragmentación de ADN, en células espermáticas de rata macho *Wistar* con administración oral del extracto metanólico crudo de *Opuntia ficus-indica* y sus particiones. a) Control negativo; núcleo de células espermáticas sin daño, se aprecia la integridad del material genético. b) Control positivo; células con fragmentación de ADN. c) Grupo administrado con el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica*; se observa el ADN fragmentado, con frecuencia importante de rupturas de cadena sencilla en el ADN, se aprecia la dispersión del material genético de la célula. d) Grupo administrado con la partición insoluble en cloroformo; núcleo de células espermáticas con baja frecuencia de daño, se aprecia la integridad del material genético. e) grupo administrado con la partición soluble en hexano; células con fragmentación de ADN y f) grupo administrado con la partición soluble en cloroformo; se observa el ADN fragmentado, con alta frecuencia de rupturas de cadena sencilla en el ADN, se aprecia la dispersión del material genético de la célula.

La partición clorofórmica disminuyó significativamente la concentración espermática, la motilidad y la viabilidad espermática, así mismo los niveles de testosterona en suero presentan una disminución significativa con respecto a los controles (tabla 4). El nivel de daño observado en las cadenas de ADN de las células espermáticas del grupo tratado con la partición clorofórmica, presenta altas rupturas, con un promedio de migración de 13221 μm , lo que se traduce como niveles altos de migración de ADN. En un trabajo con ratas donde

se administró extracto etanólico de *Lagenaria breviflora*,⁴⁰ los espermatozoides presentaron anomalías en la morfología pero la viabilidad de las células estaban dentro del rango de las ratas control, lo que demuestra que el extracto no afectó la viabilidad de espermatozoides pero causó la deformación de las células afectando su movilidad; caso contrario a este estudio donde los parámetros de la concentración espermática, motilidad y viabilidad fueron afectados significativamente en comparación con el grupo control. Otro reporte pero con extracto etanólico al 50 % de la raíz de *Martynia annua* dio como resultado un nulo conteo de los espermatozoides testiculares y epididimales causando lesiones en los túbulos seminíferos relacionados con la dosis administrada.⁴ En una 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,⁴¹ lo cual refleja resultados similares a esta investigación. Ratas macho administradas con nanopartículas de plata de diferente tamaño y bajo diferentes tiempos de exposición reveló que estas causaron disminución en el conteo de espermatozoides, en paralelo aumentó los niveles de daños en células espermáticas evaluadas por electroforesis en gel de células individuales, la morfología espermática se vio comprometida⁴² observándose gran similitud en los resultados encontrados en nuestra investigación, a razón que de una menor viabilidad y motilidad se aumenta el nivel de daño en las dobles cadenas de ADN espermático.

En la figura 2, se muestran las micrografías de cortes histológicos de testículos de ratas Wistar, en el grupo control negativo se observa una morfología normal con una elevada densidad de células espermáticas, no se observó vacuolización y se observaron límites celulares bien definidos y estructura de la apariencia histológica normal; en el grupo control positivo y el grupo 1, se observa una inhibición de la espermatogénesis, daño generalizado en el tejido testicular, presencia de abundantes vacuolas, signos de necrosis y alteración de la arquitectura testicular normal caracterizada por la desorganización y amplias zonas carentes de células; en el grupo 2 se observa una disminución en la densidad de células espermáticas en el haz de luz de los túbulos seminíferos, presencia de abundantes vacuolas, desorganización y amplias zonas carentes de células. En el grupo 3 y 4 la densidad espermática con respecto a los grupos 1 y 2 se encuentra aumentada, así mismo se observa en estos grupos una vacuolización de la estructura testicular. En un estudio similar pero con el extracto metanólico de *Tagetes lucida*⁴³ se reportó que la estructura testicular al igual que en esta investigación se veía comprometida, observando una relación estrecha entre la

concentración espermática y la densidad espermática observada en el haz de luz de los túbulos seminíferos.

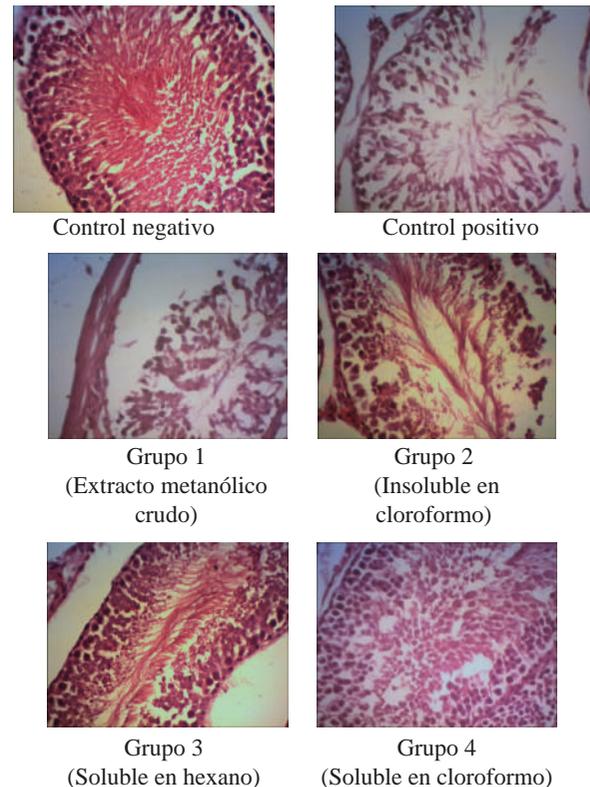


Figura 2. Cortes histológicos de testículo de las ratas tratadas con el extracto metanólico y sus particiones de *Opuntia ficus-indica* y controles.

Grupo control negativo: se observa una morfología normal con una elevada densidad de células espermáticas, no se observó vacuolización y se observaron límites celulares bien definidos y estructura de la apariencia histológica normal; **Grupo control positivo y grupo 1:** se observa una inhibición de la espermatogénesis, daño generalizado en el tejido testicular, presencia de abundantes vacuolas, signos de necrosis y alteración de la arquitectura testicular normal caracterizada por la desorganización y amplias zonas carentes de células; **Grupo 2:** se observa una disminución en la densidad de células espermáticas en el haz de luz de los túbulos seminíferos, presencia de abundantes vacuolas, desorganización y amplias zonas carentes de células; **Grupo 3 y 4:** la densidad espermática con respecto a los grupos 1 y 2 se encuentra aumentada, así mismo se observa en estos grupos una vacuolización de la estructura testicular.

Conclusiones

La administración oral del extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* a ratas macho Wistar produjeron efectos en la calidad espermática y estructura testicular, específicamente en los túbulos seminíferos. Así mismo la partición soluble en clo-

roformo y soluble en hexano, realizadas al extracto metanólico alteraron los parámetros de la calidad espermática y la estructura testicular. Probablemente los compuestos presentes en el extracto metanólico de *Opuntia ficus-indica* tengan influencia inhibitoria sobre la liberación de las hormonas gonadotrópicas las cuales a su vez son las responsables de la producción de testosterona por lo que al verse afectadas dichas hormonas, se produce una disminución de la producción de testosterona, lo que conduce a cambios en la espermatogénesis contrastada con la afectación de la concentración espermática, viabilidad y motilidad así mismo el daño en la estructura testicular, aunado a su efecto genotóxico. Se proponen estudios complementarios para evaluar completamente la fertilidad y reversibilidad con este extracto y otras fracciones de esta planta.

Agradecimientos

CONACYT por la beca otorgada 305943

Referencias

- 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.
- Téllez-López MA, Ávalos-Soto J, Morán-Martínez J, Hernández-González S, Treviño-Neávez 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.
- Gopalkrishnan B, Shimpi SN. Antifertility effect of *Madhuca latifolia* (ROXB.) macbride seed extract. IJABPT. 2011; 2(4):50-53.
- 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.
- Universidad Nacional Autónoma de México. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=&t=anticonceptivo&id=1611>. Acceso 21 Mar 2013.
- 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.
- Brugo-Olmedo S, Chillik C, Kopelman S. Definición y causa de la infertilidad. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2003; 54(4):227-248.
- Amory JK, Page ST, Bremner WJ. Drug insight: recent advances in male hormonal contraception. Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 2006; 2(1):32-41.
- Talwar GP, Raghuvanshi P, Misra R, Mukherjee S, Poonam R, Shah S. Plant immunomodulators for termination of unwanted pregnancy and for contraception and reproductive health. Immunology and Cell Biology. 1997; 75: 190-192.
- Fernández-López JA, Almela L, Obón JM, Castellar R. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. Plant Foods Hum Nutr. 2010; 65(3):253-9.
- Butterweck V, Semlin L, Feistel B, Pischel I, Bauer K, Verspohl EJ. Comparative evaluation of two different *Opuntia ficus-indica* extracts for blood sugar lowering effects in rats. Phytother Res. 2010.
- Márquez A C, F Lara O, B Esquivel R, R Mata E. Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 1999.
- Sharp PE, La Regina MC. The laboratory rat. CRS press LLC. 1998.
- SAGARPA. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- 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.
- 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.
- 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.
- Molina-Salinas G, Fernández-Said S. A modified microplate cytotoxicity assay with brine shrimp larvae (*Artemia salina*). Pharmacologyonline. 2006; 3: 633-638.
- 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 frutescens* (Berl) I.M. Johnst del Norte de México contra *Staphylococcus aureus* de aislados clínicos. Rev Mex Cienc Farm. 2013; 44(2):24-30.
- 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.
- NovaTein Biosciences. Rat Testosterone ELISA Kit. Catálogo NB-E30597.
- 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.

23. Sobarzo C, Bustos-Obregon E. Acute effect of Parathion on the seminiferous epithelium of immature mice. *Rev Chil Anat.* 2000; 18(1):61-68.
24. 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.
25. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004; 26(3):249-261.
26. 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.
27. 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.
28. Barboza J, Hilje L, Durón J, Cartín V, Calvo M. Fagodisuasión de un extracto de ruda (*Ruta chalepensis*, Rutaceae) y sus particiones sobre larvas de *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Rev Biol Trop.* 2010; 58(1): 1-14.
29. Bastos MLA, Lima MRF, Conserva LM, Andrade VS, Rocha EMM, Lemos RPL. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2009; 8(16): 1-6.
30. Almeida-Alves TM, Fonseca-Silva A, Brandão M, Mesquita-Grandi TS, Smânia EF, Júnior AS, Zani CL. Biological screening of brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2000; 95:367-373.
31. Masseur AY and Nshimo CM. Brine shrimp bioassay for biological activity of medicinal plants used in traditional medicines in Tanzania. *East African Medical Journal.* 1995; 72:661-663.
32. Solís PN, Wright CW, Anderson MM, Gupta MP, Phillipson JD. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Plant Med.* 1993; 59:250-252.
33. Nieto I, Salama A, Cataño J, Chegwin C. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. *Rev Iberoamericana Micología.* 2008; 25:186-187.
34. Vanhaecke P, Persoone G, Claus C, Sorgeloos P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia nauplii*. *Ecotoxicol Env Safety.* 1998; 5:382-387.
35. McLaughlin JL, Chang Ch, Smith DL. Simple bioassay for the detection and isolation of bioactive natural products. Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, School of Pharmacy and Pharmacal Sciences, Purdue University, West Lafayette, IN 47907, USA. 1988.
36. Lagarto-Parra A, Silva-Yhebra R, Guerra Sardiñas I, Iglesias Buela L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀) in mice in order to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine.* 2001; 8(5): 395-400.
37. Déciga-Campos M., Rivero-Cruz I., Arriaga-Alba M., Castañeda-Corral G., Angeles-López G.E., Naverrete A., Mata R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 110: 334-342.
38. Grube B, Chong PW, Lau KZ, Orzechowski HD. A natural fiber complex reduces body weight in the overweight and obese: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. 2013; 21(1):58-64.
39. Ennouri M, Fetoui H, Bourret E, Zeghal N, Attia H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. 2006; 97(12):1382-6.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Téllez-López MA, Treviño-Neávez JF, Verde-Star J, Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas A, Morán-Martínez J, Serrano-Gallardo LB, Morales-Rubio ME. Evaluación del efecto del extracto metanólico de *Tagetes lucida* sobre la función testicular y calidad espermática en ratas macho Wistar. *Rev Mex Cienc Farm.* 2013; 44(4): 43-52.