

Efecto de cinco extractos de plantas colombianas sobre espermatozoides humanos

Effect of five Colombian plant extracts on human spermatozoids

Ginet Gallego, Dubier Henao, Luisa Ospina, Ángela Álvarez Gómez, Dr. C. Víctor Arango, Dr. C. Walter Cardona Maya, Dr. C. Ángela Cadavid

Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: las pruebas de capacitación espermática y la actividad espermicida o inmovilizante usando extractos de plantas permiten incrementar los conocimientos actuales en el área reproductiva.

Objetivos: evaluar el efecto de 5 extractos de las plantas colombianas *Bocconia frutescens*, *Bomarea setaceas*, *Muehlenbeckia platyclada*, *Zanthoxylum lenticulare* y *Piper subpedale* sobre los espermatozoides humanos.

Métodos: los espermatozoides humanos se incubaron con los extractos de las plantas, se valoró su movilidad y viabilidad. Adicionalmente la capacitación espermática se evaluó utilizando albúmina sérica bovina.

Resultados: después de una evaluación inicial del efecto de los extractos de las plantas sobre la movilidad o viabilidad de los espermatozoides, se seleccionaron los extractos de *B. frutescens* y *B. setaceas* para realizar los ensayos de capacitación espermática, porque no alteraron ni la movilidad ni la viabilidad espermática, y se seleccionaron los extractos de *M. platyclada*, *Z. lenticulare* y *P. subpedale* para los ensayos de actividad espermicida debido a que afectaron la movilidad progresiva espermática.

Conclusiones: este trabajo permitió proponer 3 plantas con promisoría actividad espermicida, y se logró estandarizar un sistema biológico en el cual se pudo evaluar el efecto capacitante de algunos extractos sobre los espermatozoides humanos.

Palabras clave: espermatozoide, capacitación espermática, actividad espermicida.

ABSTRACT

Introduction: the sperm capacitation test and the spermicidal activity or immobilization using plant extracts, allows for an increase in the current knowledge on the reproductive area.

Objectives: to evaluate the effect of five extracts from Colombian plants *Bocconia frutescens*, *Bomarea setaceas*, *Muehlenbeckia platyclada*, *Zanthoxylum lenticulare* and *Piper subpedale* on human spermatozoa.

Methods: human spermatozoa were incubated with each extract and their motility and viability were evaluated. Additionally, sperm capacitation was evaluated using bovine serum albumin.

Results: after an initial assessment of the effect of plant extracts on human spermatozoa, the extracts from *B. frutescens* and *B. setaceas* were selected for capacitating tests since they did not change the sperm motility and viability. Additionally, *M. platyclada*, *Z. lenticulare* and *P. subpedale* extracts were selected for immobilization or spermicidal activities tests because they had had an effect on sperm progressive motility.

Conclusions: this study suggested three plants with promising spermicidal effect; in addition to the standardization of a biological system, allowing the assessment of the capacitation effect of some extracts over human spermatozoa.

Key words: spermatozoa, sperm capacitation, spermicidal activity.

INTRODUCCIÓN

En el proceso reproductivo, los espermatozoides desempeñan un papel indispensable en la fecundación y deben viajar por el tracto reproductivo femenino en busca del oocito; durante este viaje sufren una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos conocidos como capacitación espermática que les permite adquirir la habilidad para interactuar con el oocito.¹ De otro lado, existe un creciente interés por determinar algunas características biológicas de los productos vegetales, con el fin de obtener de ellos un beneficio para la población humana;² la reproducción no es la excepción y para ello se han evaluado distintos productos naturales en varios procesos reproductivos como la gametogénesis, el desplazamiento del espermatozoide por el tracto reproductivo femenino, la ovulación y la interacción espermatozoide-oocito, entre otras.³ Varios estudios han reportado que los extractos de diferentes plantas como *Citrus lemon* (limón),⁴ *Passiflora edulis* (maracuyá)⁵ y *Ananas comosus* (piña)³ presentan actividad espermicida en humanos.

Los espermicidas son sustancias diseñadas para prevenir el embarazo mediante la muerte o inmovilización de los espermatozoides para que estos no puedan avanzar hacia el oocito y fecundarlo.⁶ Entre la amplia posibilidad de anticonceptivos, los espermicidas son un método de fácil acceso, de bajo costo, controlado por la mujer⁷ y son elaborados en diferentes presentaciones como cremas, jaleas, espumas, óvulos o tabletas;⁸ sin embargo, a pesar de sus ventajas los espermicidas son elaborados en su mayoría sobre la base de Nonoxynol-9, compuesto que ha sido altamente asociado con el incremento de irritaciones cervicales y vaginales, lo

que puede favorecer la afección por los microorganismos infecciosos⁹ y la alteración del crecimiento de los lactobacilos.^{10,11}

Como se mencionó antes, la capacitación espermática es un proceso importante en la reproducción natural, y esta es inducida en los laboratorios de reproducción asistida con el fin de poder mejorar la probabilidad de interacción *in vitro* entre los espermatozoides y el oocito.¹² Existe un reporte local sobre el efecto capacitante del extracto de *Carica papaya* (papaya),¹³ lo cual permite proponer que moléculas de origen vegetal podrían inducir este efecto a un menor costo que las usadas actualmente, como la albúmina sérica bovina que incrementa los costos de algunos procedimientos de laboratorio.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de 5 extractos de *Bomarea setaceas*, *Muehlenbeckia platyclada*, *Piper subpedale*, *Zanthoxylum lenticulare* y *Bocconia frutescens* sobre los espermatozoides humanos.

MÉTODOS

Muestras de semen

Las muestras de semen fueron donadas por voluntarios aparentemente sanos (18-25 años) mediante masturbación, después de una abstinencia sexual de 3 a 5 días como lo establece la Organización Mundial de la Salud.¹⁴

Análisis muestras de semen

Luego de su licuefacción (30-60 min), a cada muestra seminal se le realizó una primera evaluación macroscópica para determinar el volumen, pH y la consistencia. Posteriormente, se hizo un análisis microscópico en el que se determinó el porcentaje de movilidad espermática según los criterios de la OMS 1999,¹⁴ que clasifica los espermatozoides según su desplazamiento así: a: >25 $\mu\text{m/s}$, b: 5-25 $\mu\text{m/s}$, c: <5 $\mu\text{m/s}$ y d: inmóviles. En este estudio, los espermatozoides móviles progresivos a y b se analizaron de forma conjunta. Adicionalmente, se evaluó el porcentaje de viabilidad, usando 10 μL de la muestra seminal con 10 μL de eosina-Y, contando como espermatozoides vivos aquellos que no tenían su cabeza teñida con el colorante. Finalmente, se evaluó el número de espermatozoides por mililitro mediante la cámara de *Makler*.¹⁵ Todas las muestras utilizadas debían cumplir con los parámetros siguientes: movilidad a + b > 50 %, viabilidad > 70 % y concentración > 20 x 10⁶/mL.

Extractos vegetales

Se usaron 5 plantas disponibles en el Herbario de la Universidad de Antioquia (HUA) de Medellín, Colombia, las cuales habían sido colectadas en los departamentos de Antioquia (tallos y hojas de *B. setaceas* 130210 HUA, semillas de *B. frutescens* 104402 HUA, hojas de *M. platyclada* 2533 HUA, y hojas de *Z. lenticulare* 112371 HUA) y Caldas (tallos y hojas de *P. subpedale* 164512 HUA) por diferentes biólogos expertos en el tema.

Los extractos de las 5 plantas se obtuvieron en el Laboratorio de Química de Plantas Colombianas de la Universidad de Antioquia, siguiendo los protocolos estandarizados. A continuación, a las partes seleccionadas de cada una de las plantas previamente secas, se le adicionó solución salina 0,85 % y se agitó durante

5 min; después los extractos de cada planta se filtraron y se almacenaron protegidos de la luz a 4 °C hasta su uso. No se utilizaron solventes orgánicos para la extracción porque estos pueden alterar la fisiología espermática.

Análisis de las propiedades de los extractos sobre las muestras de semen

Se mezclaron 30 µL de cada extracto de las diferentes plantas y 30 µL de semen para obtener una concentración de 50 % del extracto (proporción 1:1 v/v); después se tomaron 10 µL de la mezcla y se determinó la movilidad y la viabilidad usando un microscopio de luz (40X), en un intervalo entre 0 y 5 min. Todos los ensayos se hicieron por duplicado usando 3 muestras diferentes de semen. Esta evaluación inicial permitió clasificar los extractos según su capacidad de afectar la movilidad o viabilidad espermática o de mantenerla a lo largo del tiempo.

Ensayos de actividad espermicida o inmovilizante

Los extractos que mostraron efecto deletéreo sobre los parámetros espermáticos, se evaluaron nuevamente usando otras 4 muestras de semen y ampliando a 10 min el intervalo de tiempo para la valoración.

Ensayos de capacitación

Los extractos que no mostraron efecto deletéreo sobre la viabilidad y la movilidad espermática se usaron para realizar los ensayos de capacitación, siguiendo los protocolos previamente descritos por nuestro grupo.¹⁶ A continuación, se realizó una selección de los espermatozoides móviles usando el método de gradiente (Silselect®) mediante centrifugación de la muestra de semen a 1 600 rpm/20 min, los espermatozoides móviles recuperados se incubaron a 37 °C/5 % CO₂ durante toda la noche en un ángulo de 45° de inclinación. Para cada tratamiento se hicieron 2 diluciones de los extractos (12 y 25 %) en un volumen final de 1 mL de medio HAM F-10 con 1 % de antibiótico. Como controles positivo y negativo los espermatozoides se incubaron en medio con 35 mg/mL de albúmina sérica bovina y medio solo, respectivamente. Por último, se hizo la valoración de la movilidad después de 12 h de incubación y se reportó el porcentaje de espermatozoides móviles. La capacitación espermática es evidenciada por cambios fisiológicos y bioquímicos, que desencadenan un cambio característico en el desplazamiento del espermatozoide y un aumento en el bateo de la cola.¹

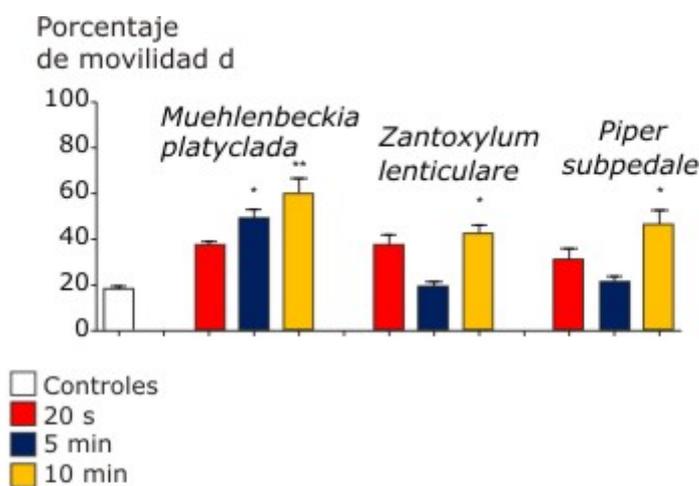
Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo determinando los valores de la media y la desviación estándar de la movilidad y la viabilidad espermática antes y durante la incubación con cada extracto. Se compararon los valores en cada grupo usando la prueba de ANOVA no paramétrica Kruskal-Wallis y el posprueba de Dunn's mediante el programa estadístico prisma 5.0®.

RESULTADOS

El promedio de volumen eyaculado de las muestras de semen de los 7 individuos fue de 4,83 ± 1,26mL; el pH de 8,27 ± 0,40; la concentración de 71 ± 42,8 x 10⁶/mL, la movilidad a + b inicial fue de 70,4 + 11,8 y la viabilidad obtenida de 76,5 ± 4,6 %. Todas las muestras fueron normozoospermicas.

Se determinó que los extractos de *M. platyclada*, *Z. lenticulare* y *P. subpedale* disminuyen la movilidad espermática progresiva de manera significativa a los 10 min de contacto con cada extracto, como lo evidenció el aumento de la movilidad tipo d (espermatozoides inmóviles) respecto a los controles, los cuales se incrementaron desde 18,2 % en el control, hasta 60,3; 42,6 y 46,6 % ($p < 0,001$; $p < 0,05$ y $p < 0,05$, respectivamente). Sin embargo, con el extracto de *M. platyclada* se observó un aumento significativo de los espermatozoides con movilidad d ($p < 0,05$) a partir de los 5 min de contacto con el extracto. En el caso específico de *Z. lenticulare* y *P. subpedale*, se observó cómo la movilidad tipo d aumentó respecto al control en la observación inicial (20 s), aunque a los 5 min disminuyó, indicando que el efecto inmovilizante puede ser reversible a corto plazo; sin embargo, es claro que a un tiempo de exposición mayor al extracto (10 min), los espermatozoides en su mayoría pasan a ser inmóviles (Fig. 1).



** ($< 0,01$) y * ($< 0,05$) representan diferencia significativa respecto al control.

Fig. 1. Ensayos de actividad inmovilizante. La movilidad espermática se valoró después de poner en contacto los extractos con las muestras de semen durante 20 s, 5 y 10 min.

De otro lado, los extractos de las plantas *B. frutescens* y *B. setaceas* no alteraron la viabilidad y la movilidad en los ensayos iniciales. El porcentaje de espermatozoides de movilidad d solo aumentó de 18,2 % hasta 27,2 y 28,2 % a los 20 s de exposición al extracto de *B. setaceas* y *B. frutescens*, respectivamente; en este caso no hubo aumento significativo de los espermatozoides con movilidad tipo d en ninguno de los tiempos de contacto con el extracto, manteniéndose por debajo de 30 %, lo cual indica el predominio de los espermatozoides con movilidad progresiva (Fig. 2).

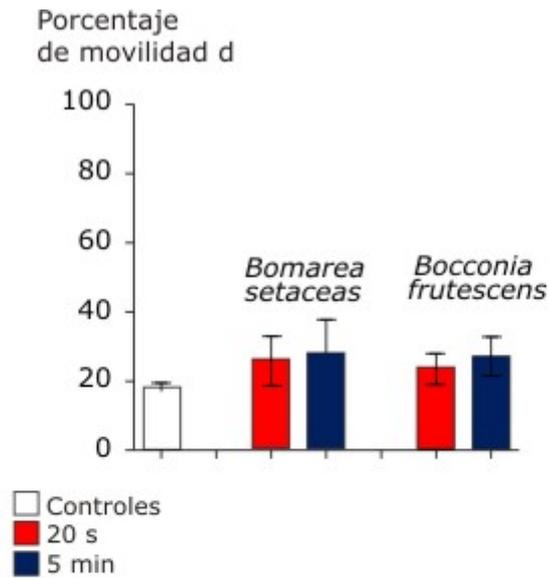


Fig. 2. Extractos sin efecto deletéreo inicial sobre la movilidad espermática. La movilidad espermática se valoró después de 12 h de incubar los espermatozoides seleccionados con 2 diluciones (12 y 25 %) de los extractos de las plantas. No se encontraron diferencias estadísticas respecto al control.

En el caso de la viabilidad espermática, no hubo ninguna diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los controles y aquellos correspondientes a los espermatozoides incubados con los 5 extractos en los distintos lapsos de tiempo (tabla).

Tabla. Viabilidad espermática después de la exposición con cada extracto

	Porcentaje de viabilidad		
	20 s	5 min	10 min
<i>Muehlenbeckia platyclada</i>	70,7 ± 0,8 ^a	68,5 ± 3,0	67,7 ± 2,0
<i>Zantoxylum lenticulare</i>	63,5 ± 3,0	63,2 ± 0,8	63,3 ± 1,2
<i>Piper subpedale</i>	69,2 ± 6,5	67,3 ± 15,8	67,0 ± 3,2
<i>Bocconia frutescens</i>	71,3 ± 3,9	70,2 ± 2,4	
<i>Bomarea setaceas</i>	72,5 ± 6,6	69,2 ± 2,6	

^a: los resultados se presentan como la media ± DE del porcentaje de la viabilidad espermática.

La evaluación de la capacitación espermática, evidenciada por la movilidad 12 h después de la incubación, mostró que ni *B. setaceas* y *B. frutescens* tienen efecto capacitante sobre los espermatozoides humanos. Después de 12 horas de incubación con ambas concentraciones (12 y 25 %) de los extractos *B. setaceas* y *B. frutescens* no se observó la movilidad ($p < 0,05$) característica del fenómeno de capacitación espermática encontrada en el control, 0 y 0 vs. $81 \pm 3,6$, respectivamente.

DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que 3 de las 5 plantas colombianas evaluadas presentan una promisoriosa acción espermicida (*M. platyclada*, *Z. lenticulare* y *P. subpedale*), debido a una disminución de la movilidad progresiva de los espermatozoides humanos. Los 2 extractos restantes, *B. frutescens* y *B. setaceas*, no presentaron el mismo efecto, proponiéndose como compuestos con posible acción capacitante. Ninguno de los extractos disminuyó la viabilidad espermática.

La mayoría de los productos espermicidas disponibles en el mercado son fabricados sobre la base de Nonoxynol-9, un agente no iónico ampliamente utilizado en el mundo y capaz de dañar la membrana plasmática de los espermatozoides y ocasiona su muerte,¹⁷ aunque también se ha probado el efecto espermicida de productos naturales como el *Aloe barbadensis*,¹⁸ el *Citrus lemon*,⁴ la *Passiflora edulis* y la *Ananas comosus*,³ y el efecto antiespermatogénico de la planta *Momordica charantia*.¹⁹ En el presente estudio se observó que los extractos de las plantas *M. platyclada*, *Z. lenticulare* y *P. subpedale* presentan efecto inmovilizante sobre los espermatozoides humanos, y en el futuro se podrían hacer nuevos estudios con el fin de evaluar el compuesto específico que tenga efecto sobre la movilidad o viabilidad espermática y que traiga consigo más beneficios y en lo posible menos efectos secundarios, como las irritaciones o el daño celular que ocurren en el caso de la utilización continua de espermicidas sobre la base de Nonoxynol-9.²⁰ Así mismo con estos extractos se podría realizar una evaluación de actividad antiviral y determinar si estos pueden ejercer un papel en la protección contra agentes infecciosos como el virus de la inmunodeficiencia humana, la hepatitis B o el herpes virus; porque con los productos sobre la base de Nonoxynol-9 este aspecto ha sido evaluado y se ha encontrado que a pesar de su función como microbicida, ocasiona alteraciones epiteliales que hacen que la usuaria del producto se encuentre más expuesta a las infecciones de transmisión sexual.²¹⁻²² Por estas razones es importante buscar componentes de procedencia natural que permitan desarrollar nuevos productos cuyas características contribuyan al control de la natalidad sin generar lesiones, y evitar que causen efectos secundarios que alteren la salud de las personas que pueden utilizarlos, además de brindar protección contra las infecciones de transmisión sexual, valores agregados respecto a las opciones en anticoncepción que se tienen actualmente.

En conclusión, aunque 2 extractos de las plantas usadas en este estudio no mostraron efecto inmovilizante a corto plazo, tampoco mostraron un efecto capacitante de los espermatozoides *in vitro*. Sin embargo, es importante resaltar que aunque no se obtuvieron resultados positivos en cuanto a su efecto capacitante, este trabajo deja planteada una metodología y un procedimiento para probar nuevos extractos y seguir avanzando en la búsqueda de alternativas como herramientas a las técnicas de reproducción asistida.

AGRADECIMIENTOS

Al biólogo Juan Fernando Álzate por la recolección del material vegetal. A la Universidad de Antioquia y al Instituto Tecnológico Metropolitano por el apoyo económico para el desarrollo del proyecto. Walter Cardona Maya y Ángela Álvarez Gómez recibieron apoyo económico de COLCIENCIAS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Burkman LJ. Gametes: The spermatozoon. Great Britain: University Press, Cambridge; 1995. p. 122-139.
2. Taira T, Toma N, Ishihara M. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinases from pineapple (*Ananas comosus*) leaf. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005;69(1):189-96.
3. Alvarez-Gomez AM, Cardona-Maya WD, Castro-Alvarez JF, Jimenez S, Cadavid A. Nuevas opciones en anticoncepción: posible uso espermicida de plantas colombianas. *Actas Urol Esp*. 2007;31(4):372-81.
4. Clarke GN, McCoombe SG, Short RV. Sperm immobilizing properties of lemon juice. *Fertil Steril*. 2006;85(5):1529-30.
5. Alvarez Gomez AM, Cardona Maya W, Forero J, Cadavid A. Human spermicidal activity of *Passiflora edulis* extract. *J Reproduction Contraception*. 2010;21(2):95-100.
6. Grimes DA, Lopez L, Raymond EG, Halpern V, Nanda K, Schulz KF. Spermicide used alone for contraception. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005;(4):CD005218. Review.
7. Cook RL, Rosenberg MJ. Do spermicides containing nonoxynol-9 prevent sexually transmitted infections? A meta-analysis. *Sex Transm Dis*. 1998;25(3):144-50.
8. Lech MM. Spermicides 2002: an overview. *Eur J Contracept Reprod Health Care*. 2002;7(3):173-7. Review.
9. Halpern V, Rountree W, Raymond EG, Law M. The effects of spermicides containing nonoxynol-9 on cervical cytology. *Contraception*. 2008;77(3):191-4.
10. Ojha P, Maikhuri JP, Gupta G. Effect of spermicides on *Lactobacillus acidophilus in vitro*-nonoxynol-9 vs. *Sapindus saponins*. *Contraception*. 2003;68(2):135-8.
11. Schreiber CA, Meyn LA, Creinin MD, Barnhart KT, Hillier SL. Effects of long-term use of nonoxynol-9 on vaginal flora. *Obstet Gynecol*. 2006;107(1):136-43.
12. Perez Peña E. Infertilidad, esterilidad y endocrinología de la reproducción. 2 ed. México: Ed. Salvat; 1995. p. 1-11.
13. Álvarez D. Evaluación de la papaína por jumping sobre la calidad espermática de pacientes que asistieron a un centro de reproducción en Medellín. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales; 1995.
14. WHO. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Switzerland: Word Health Organization; 1999. p. 7-157.

15. Cardona-Maya W, Berdugo J, Cadavid A. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. *Actas Urol Esp.* 2008;32(4):443-5.
16. Cardona-Maya WD, Cadavid AP. Evaluación de la reacción acrosomal en espermatozoides humanos inducida por los monosacáridos manosa y N-acetilglucosamina. *Actas Urol Esp.* 2005;29(7):676-84.
17. Hillier SL, Moench T, Shattock R, Black R, Reichelderfer P, Veronese F. *In vitro* and *in vivo*: the story of nonoxynol 9. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2005;39(1):1-8. Review.
18. Fahim MS, Wang M. Zinc acetate and lyophilized *Aloe barbadensis* as vaginal contraceptive. *Contraception.* 1996;53(4):231-6.
19. Naseem MZ, Patil SR, Patil SR, Ravindra, Patil RS. Antispermatic and androgenic activities of *Momordica charantia* (Karela) in albino rats. *J Ethnopharmacol.* 1998;61(1):9-16.
20. Kreiss J, Ngugi E, Holmes K, Ndinya-Achola J, Waiyaki P, Roberts PL, et al. Efficacy of nonoxynol 9 contraceptive sponge use in preventing heterosexual acquisition of HIV in Nairobi prostitutes. *JAMA.* 1992;268(4):477-82.
21. Gupta G. Microbicidal spermicide or spermicidal microbicide? *Eur J Contracept Reprod Health Care.* 2005;10(4):212-8.
22. Jain JK, Li A, Nucatola DL, Mino P, Felix JC. Nonoxynol-9 induces apoptosis of endometrial explants by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Biol Reprod.* 2005;73(2):382-8.

Recibido: 7 de abril de 2011.

Aprobado: 12 de octubre de 2011.

Ángela Cadavid. Grupo Reproducción. Universidad de Antioquia, A.A. 1226. Medellín, Colombia. Correos electrónicos: angelap.cadavid@gmail.com; reproduccion@medicina.udea.edu.co