

DISTURBIOS EN LA REPRODUCCION DEL RATON CAUSADOS POR *SPONDIAS MOMBIN*

Noralba Sierra Martínez *
Fabiola Buchelli Varona *
Luis Arturo Gil Pedraza **
Jorge E. Olarte Caro. **

Resumen:

Con el presente trabajo el cual complementa una reciente publicación (1), se pretende comprobar la actividad antifertilizante de la *Spondias mombin* (jobo), planta popularmente utilizada por los indígenas Tikunas del Amazonas como contraceptivo.

Los resultados demuestran que la planta presenta actividad estrogénica "in vivo" e "in vitro", ocasionando alteraciones en el ciclo estral y la fertilidad del ratón hembra.

Summary:

This work is complement of a previous publication (1), and was aimed to show the antifertility activity of *Spondias mombin* (jobo), which is used as a contraceptive by the Tikunas Indians of the Amazonas area.

The results demonstrated that this plant has estrogenic activity "in vivo" and "in vitro", and produces alteration in the oestrus cycle and the fertility of the female rats.

como agentes contraceptivos, abortivos, estimulantes uterinos, estrogénicos, citotóxicos, oxitóxicos y antifertilizantes en general (3,4).

En reciente publicación (1) se presentaron los resultados obtenidos para la *Helicteres baruensis* (tuercemadre), planta utilizada por los campesinos de Cundinamarca y Tolima como anticonceptivo (5).

En este artículo presentamos los resultados obtenidos para la *Spondias mombin* (jobo), de la cual los indígenas Tikunas del Amazonas utilizan la decocción de la corteza con los fines mencionados (6).

Osteau L. y Gallego E. en 1981 (7), demostraron que la *Spondias mombin* posee dentro de sus principios el β -sitosterol, sustancia que había sido anteriormente reportada como estimulante uterino (8).

II. MATERIALES Y METODOS

1. MATERIAL VEGETAL

La planta a estudiar se recolectó en la finca "El placer", ubicada en La Mesa (Cundinamarca). El ejemplar fué identificado como *Spondias mombin* L.N.V., conocido popularmente como "hobo" o "jobo" y clasificado bajo el número 14105 en el Herbario Nacional Colombiano.

Las especies de este género se conocen con el nombre vulgar de "hobo" o "jobo" en Antioquia, Cundinamarca, Valle y Amazonas, "Hobo de Castilla" en Bolívar, "hobo colorado" y "hobo arisco" en Tumaco. Es un árbol de 20 a 35 metros de altura con corteza rojiza, hojas coriáceas, flores de color crema y frutos ácidos. Esta descripción concuerda con la reportada para *Spondias mombin* (6).

El presente artículo al igual que el publicado anteriormente (1) se extrajo del trabajo "Disturbios en la reproducción del ratón causados por *Spondias mombin* y *Helicteres baruensis* (2), realizado en el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional con la financiación de COLCIENCIAS y PLAMIRH (Programa Latinoamericano para la Investigación en la Reproducción Humana).

I. INTRODUCCION

Un buen número de informaciones populares reportan el uso de plantas en animales y humanos

* Estudiantes de tesis

** Profesores Facultad de Ciencias

1.1. Preparación del material vegetal.

Se utilizó la corteza del árbol, desde el nivel del suelo hasta la altura de 1 metro, los trozos de corteza obtenidos, se sometieron a secado molienda y posterior tamización, en la misma forma como se operó en el trabajo anterior (1).

1.2. Preparación del extracto de la planta.

El extracto acuoso de la corteza molida se preparó por infusión al 5%; a partir de este extracto se administraron las dosis a los animales.

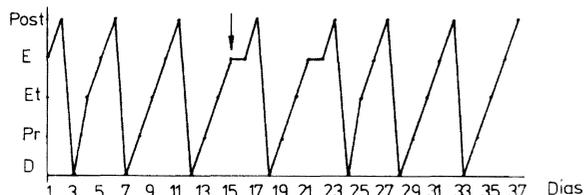
2. MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado fueron ratones hembras, se mantuvieron en las mismas condiciones y se sometieron a los mismos controles preliminares descritos en la publicación anterior (1).

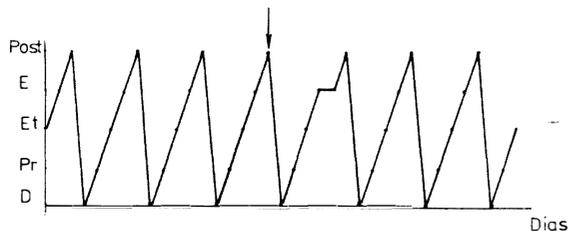
III. PARTE EXPERIMENTAL

Se siguió el procedimiento descrito en la publicación anterior (1). Luego de someter los animales a un periodo de adaptación del 5 días, se inició la observación del ciclo estral normal,

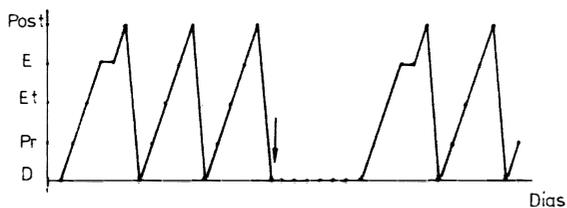
Inyección en estro



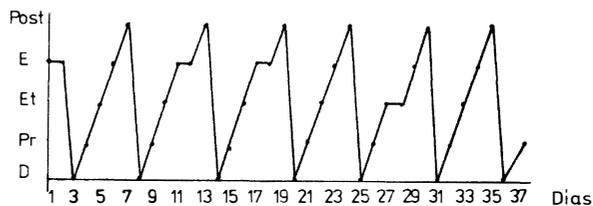
Inyección en post-estro



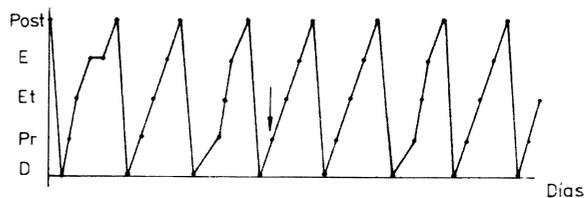
Inyección en diestro



Control



Inyección en proestro



Inyección en estro-temprano

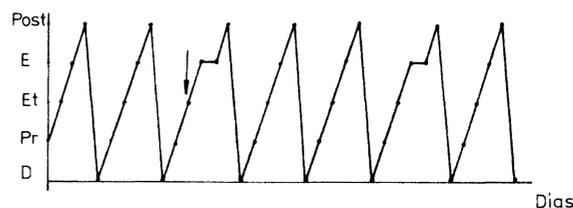


FIGURA 1 Alteraciones típicas sobre el ciclo estral causadas por la administración de una dosis única intraperitoneal de *Spondias mombin* en cada fase del ciclo.

↓ Administración de la inyección

durante otros 15 días. La siguiente etapa comprendió la administración del extracto y la observación de las alteraciones provocadas sobre el ciclo estral.

En los experimentos en que así fue necesario, los animales cuyo ciclo fué regular durante 15 días, se colocaron en su periodo de celo (estro) en presencia del macho; mediante un frotis vaginal se estableció la ocurrencia del coito; las hembras que se encontraron preñadas se pesaron diariamente hasta el final de la gestación.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

1. ENSAYOS FARMACOLOGICOS PRELIMINARES

1.1. Identificación de los estados del ciclo estral.

La identificación y caracterización de los estados del ciclo estral se realizó mediante citología vaginal (9) y fué la misma descrita en el artículo anterior (1).

1.2. Vías de administración y dosis útiles.

Por vía oral se ensayaron en el agua de bebida dosis entre 1,6 y 83,33 g/kg, sin observarse efectos tóxicos; dosis superiores a 8,3 g/kg inclusive, provocaron alteraciones claras en el ciclo estral.

Por vía intraperitoneal se ensayaron dosis desde 0,3 hasta 6,6, g/kg de peso, encontrándose efectos letales a dosis superiores a 0,8 g/kg; se determinó que una dosis de solo 0,25 g/kg altera el ciclo estral sin toxicidad aparente en un periodo de 15 días.

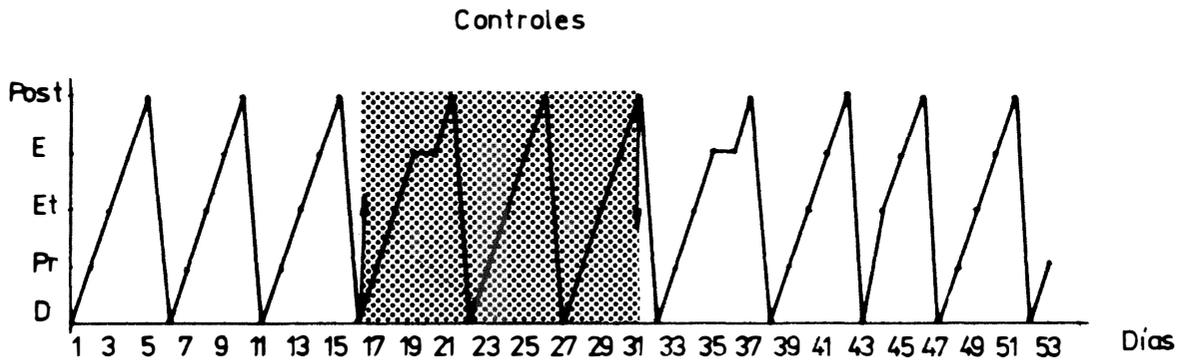
2. ENSAYOS ESPECIFICOS

2.1. Alteraciones en el ciclo estral causadas por la administración de una dosis única en las diferentes fases del ciclo.

Se utilizó una dosis única intraperitoneal de 0,25 g/kg aplicada durante cada una de las fases del ciclo estral.

En la figura 1. podemos observar que al administrar una dosis única, en las fases del proestro, estro temprano, estro y post-estro no se produjo ninguna alteración significativa respecto al grupo de animales control administrados con solución salina isotónica.

Vía intraperitoneal



Experimentales

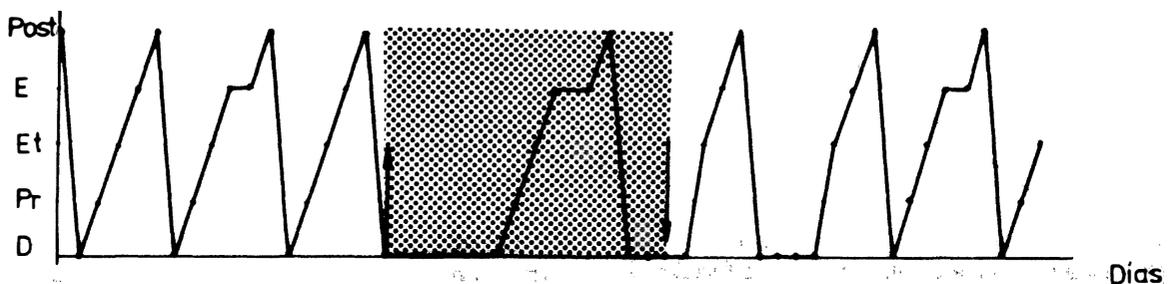


FIGURA 2. Alteraciones típicas sobre el ciclo estral causadas por la administración de dosis diarias de Spondias mombin.

Por otra parte en los animales que se inyectaron con una dosis única en diestro, se indujeron alteraciones consistentes en prolongación de esta fase por varios días y en general ciclos estrales muy irregulares; este fenómeno no se presentó en las hembras de los grupos control.

2.2. Alteraciones en el ciclo estral causadas por la administración de dosis diarias (durante 15 días) por vía intraperitoneal y por vía oral.

Para el ensayo por vía intraperitoneal, se inició la administración del extracto en la fase del diestro; se observa que de 29 animales tratados, 28 presentaron largos periodos de diestro y alteraciones variables de los ciclos, las cuales continuaban aún después de 15 días de suspendido el ensayo. Solamente 5 de los 26 animales del grupo control no ciclaron normalmente en el mismo periodo de tiempo.

El efecto residual prolongado sugiere la presencia de una sustancia que altera el funcionamiento hormonal por lo menos por cuatro ciclos después de la última dosis.

Para el ensayo por vía oral, se administró el extracto acuoso como agua de bebida a un total de 26 animales; en 24 de ellos se presentó una evidente prolongación del diestro y el estro por

Via oral

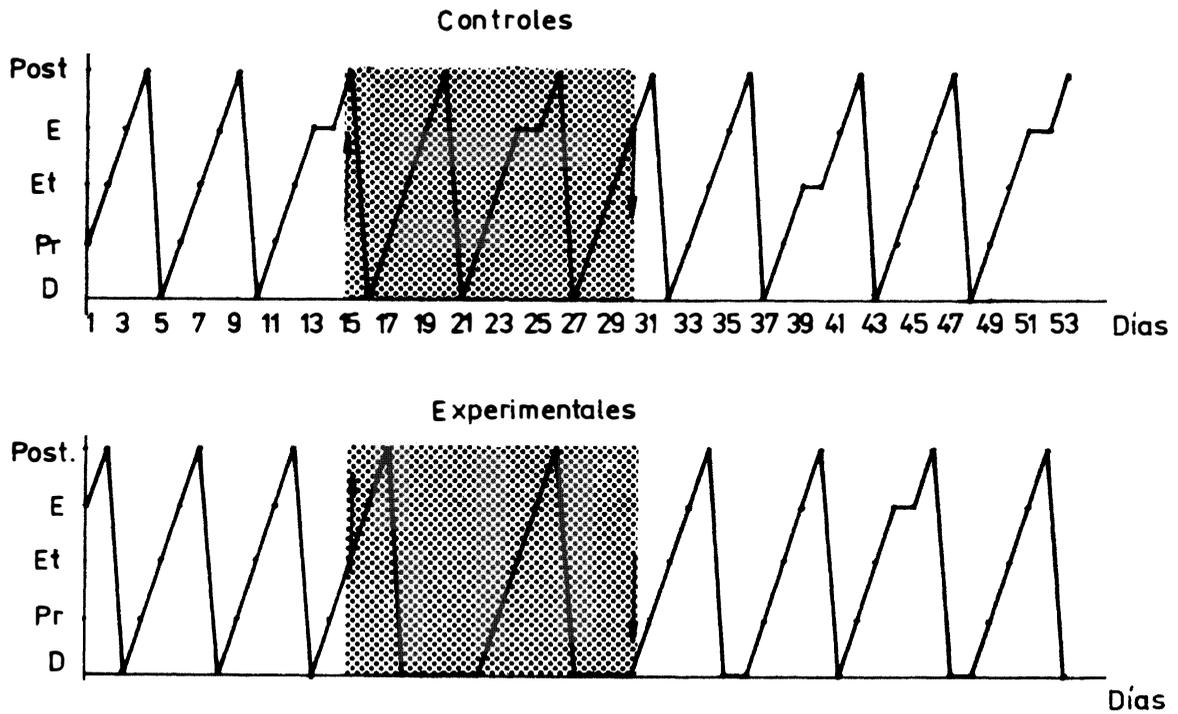
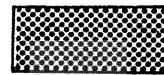


FIG. 2.(Cont.)

↑ :Iniciación del tratamiento
↓ :Suspensión del tratamiento



: Tiempo de tratamiento

varios días. Este comportamiento contrasta con el de los grupos control en los cuales de 23 animales observados solo 1 se vió alterado. La figura 2 muestra en forma general el comportamiento descrito.

2.3. Alteraciones de la receptividad y de la fecundidad causadas por la administración de dosis diarias por vía intraperitoneal y por vía oral.

Como los resultados demostraron que la administración del extracto prolongaba el estro el diestro, provocando la aparición de calores esporádicos, se considero necesario determinar si en estos periodos de calor las hembras eran receptivas al macho y en caso de ser así, comprobar su fertilidad.

2.3.1. Administración por vía intraperitoneal

Se trataron 15 animales en los cuales se observó una marcada prolongación de la fase del diestro lo cual disminuye la posibilidad de cohabitación con el macho.

Se presentó una disminución del 40% en la copulación respecto al grupo control; la fertilidad se vió notablemente disminuída, solamente el 13,3% de los animales en ensayo fueron fértiles. El promedio de crías por grupo fué menor comparado con los controles. En la figura 3 se puede apreciar este comportamiento.

En vista de estos resultados se creyó necesario determinar el efecto que una segunda administración pudiera ejercer después un periodo de descanso de 15 días.

Se estudió un grupo de 9 animales y de estos solo el 22,22% fueron fértiles, frente a un 80,0% de los animales control. Figura 4.

2.3.2. Administración por vía oral.

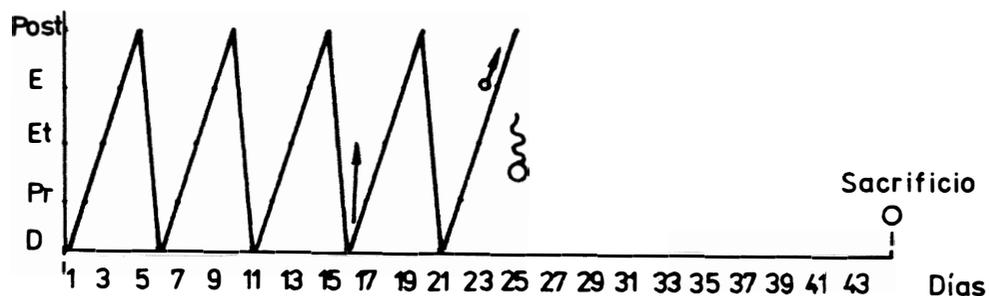
El experimento se realizó con 24 animales. La receptividad fué de 70,8% para los animales tratados con el extracto, mientras que para los animales control fué del 100%.

La fertilidad se vió disminuída en un 50% en el grupo que recibió el extracto frente a un 8% en el grupo control. Como se puede observar hubo una marcada incidencia sobre la receptividad y la frecuencia de cohabitación de los animales en tratamiento; sin embargo el efecto más notable fué la disminución de la fecundidad, este fenómeno parece deberse a la aparición de estros que, además de esporádicos son infértiles. La figura 3 muestra este comportamiento.

Durante el segundo tratamiento por vía oral, se trataron 9 animales de los cuales un 44,4% recibieron el macho en un promedio de 14 días, en tanto que en el grupo control la receptividad fue total, en solamente 7,6 días. Figura 4.

Vía intraperitoneal

Controles



Experimentales

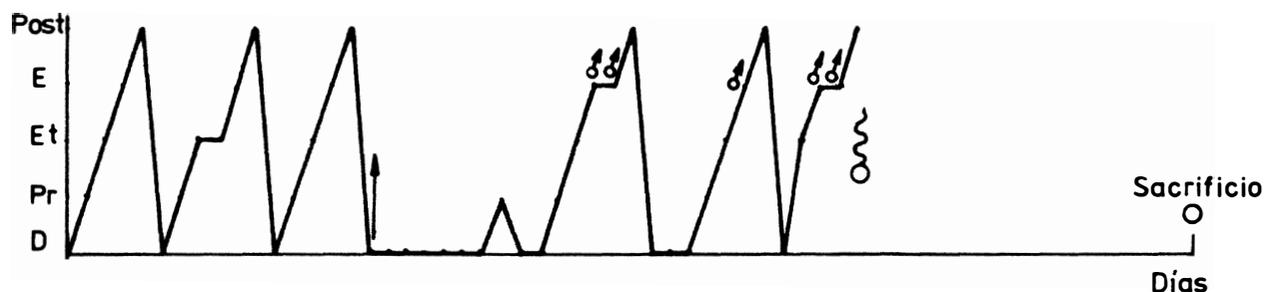
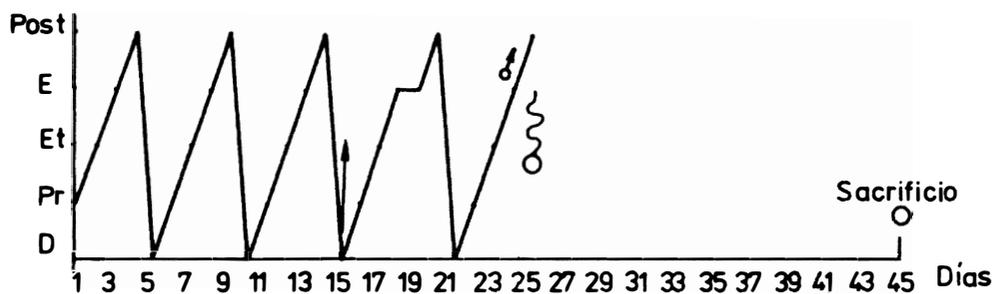


FIGURA 3. Alteraciones típicas de la receptividad y de la fecundidad causadas por la administración de dosis diarias de Spondias mombjn.

Vía oral

Controles



Experimentales

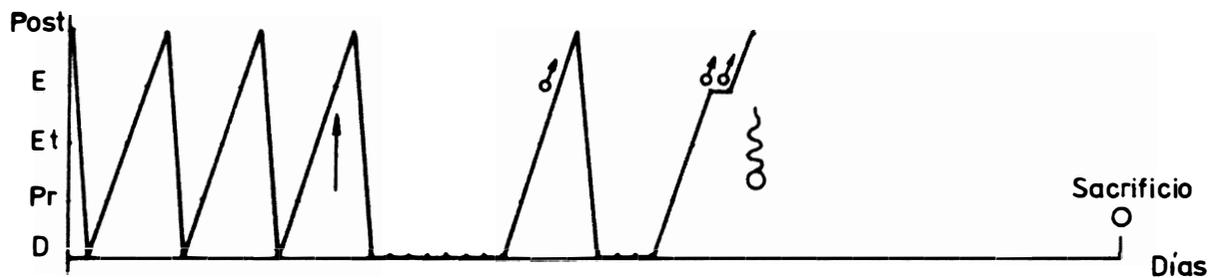


FIG. 3. (Cont.) ↑ : Iniciación del tratamiento. ♂ : Presencia del macho. ~ : Aparición de espermatozoides en vagina y suspensión del tratamiento.

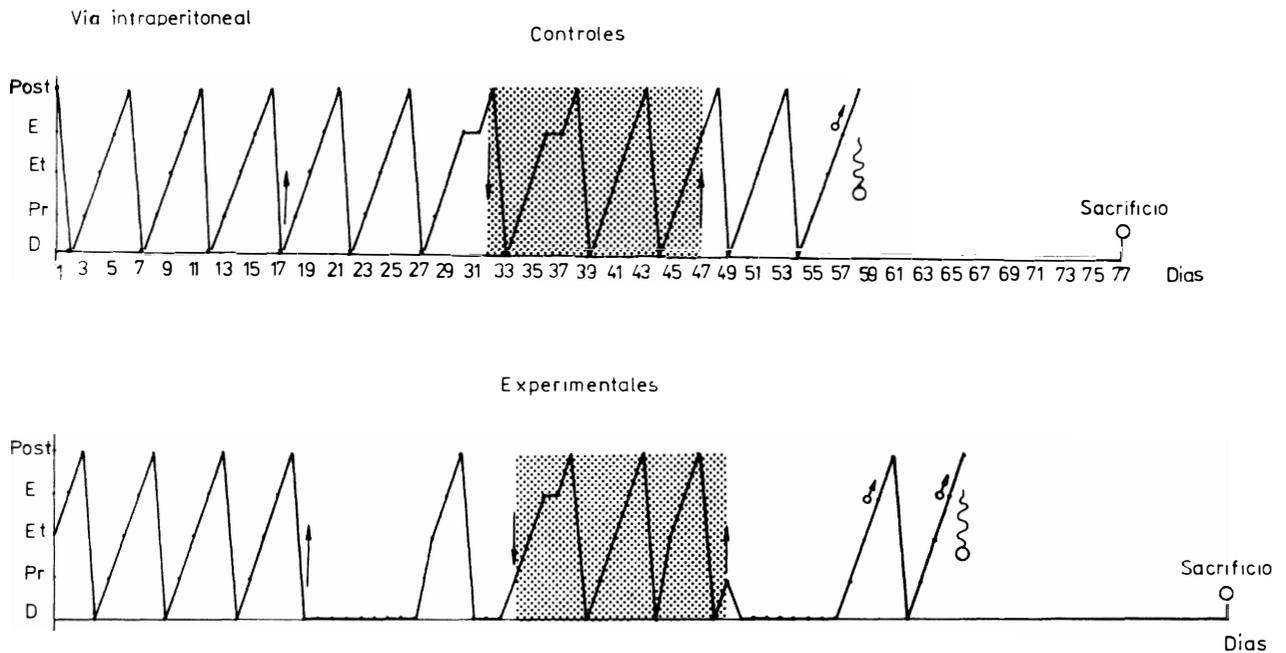
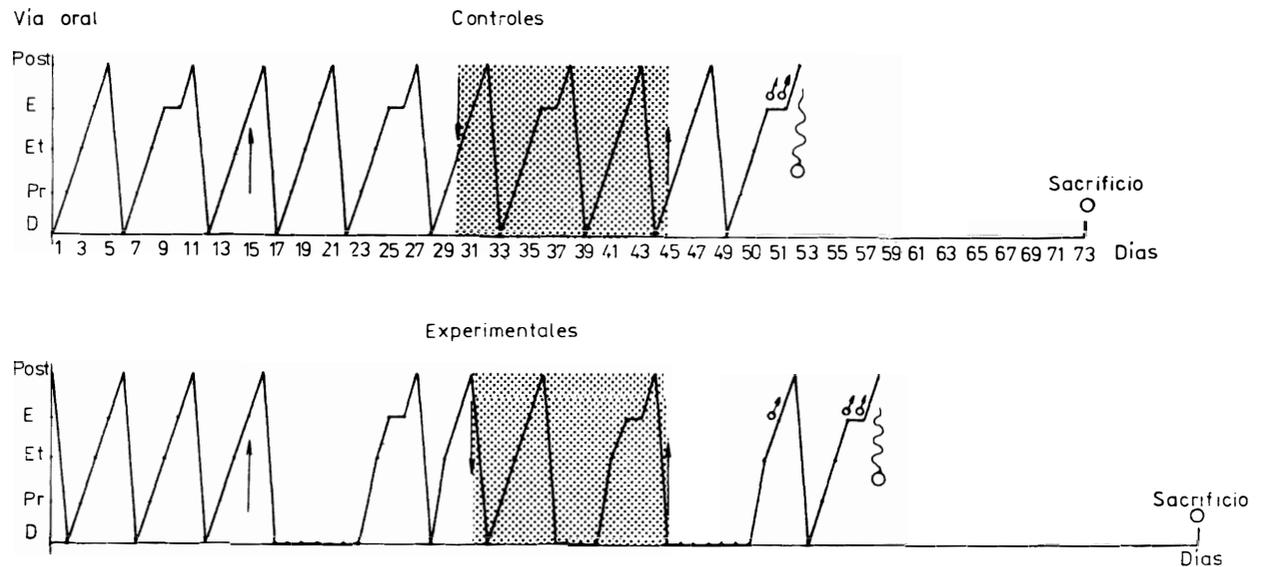


FIGURA 4. Alteraciones típicas de la receptividad y la fecundidad durante una segunda administración de Spondias mombin.



↑ : Iniciación del tratamiento. : Aparición de espermatozoides en vagina y suspensión del 2o tratamiento.
 ↓ : Suspensión del tratamiento.
 ♂ : Presencia del macho. : Intervalo entre los dos tratamientos.

2.4 Alteraciones causadas por la administración del extracto acuoso por vía oral, desde el día 1 hasta el día 19 y desde el día 10 hasta el día 19 post-coito.

Como uno de los objetivos de la investigación fue determinar si el descenso en la fertilidad se debía a un efecto antifertilizante post-coito (sobre la prefertilización; el transporte del huevo,

nidación, etc), por acción residual del principio activo de la planta; se tomaron los animales desde el momento en que se comprobó la cópula para someterlos a tratamiento por vía oral y observarlos hasta el día 19 post-coito. En este ensayo se pesaron a diario los animales gestantes y se observaron los fetos gestados para detectar posibles alteraciones en su desarrollo y crecimiento.

Se trataron 16 animales con una dosis promedio de 10 g/kg; la fertilidad del grupo experimental fué de un 37,5%, mientras que la de el grupo control fué de 84,6%.

Por el contrario, en los animales estudiados con una dosificación oral, administrada después del día 10 post-coito, no se produjo ningún cambio en la fertilidad total ni en los promedios de crías gestadas por grupo.

Estos resultados nos hacen suponer que el descenso de la fertilidad observado durante el primer experimento (del día 1 al día 19 post-coito) fue ocasionado en los primeros días de la preñez, por impedimento de la fertilización, por alteración en el transporte del huevo ó por interferencia con la implantación. Todo esto puede ser producido por un alto contenido de estrógenos en la planta; no se observó efecto abortivo ni alteraciones en el desarrollo de los fetos.

2.5. Estudio histológico.

Siguiendo el procedimiento descrito en la anterior publicación (1), se decidió estudiar histológicamente un grupo de animales tomados al azar de cada experimento.

En los grupos de animales tratados con dosis diarias del extracto por vía intraperitoneal y por vía oral (experimento 2.2.); el 65,0% de las hembras se mostraron infértiles. El cuadro morfológico de los órganos evaluados (ovarios, úteros) visto bajo el microscopio hace sospechar que el mecanismo de acción responsable del descenso de la fertilidad, sea un impedimento en la maduración folicular; por otra parte la presencia de abundantes glándulas sugiere que la misma falta de maduración del folículo, hace que el cuerpo luteo formado en un celo anterior continúe activo, dándole a estos órganos un aspecto morfológico característico de estado progestacional.

En los animales tratados bajo el experimento 2.4 (desde el día 1 hasta el día 19 post-coito), el 62,5% de estos no fueron fértiles; microscópicamente en los ovarios de estas hembras se encontró desarrollo de cuerpos luteos y una notoria falta de maduración folicular. Se sabe que la administración de dosis altas de estrógenos aumenta la motilidad del oviducto ocasionando un rápido transporte del huevo, lo cual conlleva a su degeneración por el arribo temprano al útero que aún no está en condiciones de implantarlo. Este podría ser el mecanismo por el cual se produzca la infertilidad observada.

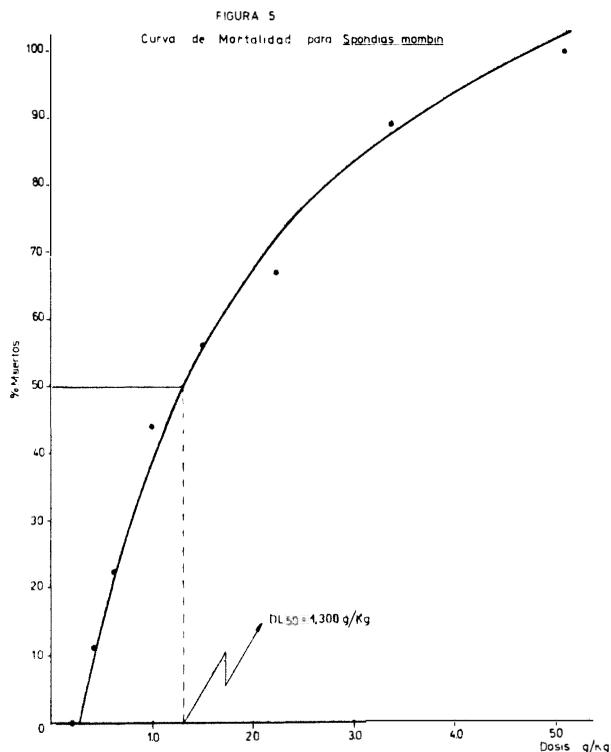
No hubo evidencia de que el extracto tenga acción letal o efectos teratogénicos sobre el embrión y los neonatos evaluados microscópicamente, no mostraron alteraciones en ninguno de

sus órganos, tanto para los animales tratados desde el día 1 hasta el día 19, como para los tratados desde el día 10 hasta el día 19 post-coito.

2.6. Estudio Toxicológico.

El estudio toxicológico, no demostró que el extracto de la planta ejerciera efectos colaterales tóxicos a dosis menores de 0.400 g/Kg por vía intraperitoneal y de 83,3 g/kg por vía oral.

Se encontró que la dosis letal 50 (DL50) fué de 1,300 g/kg de los principios solubles en agua de la corteza seca de *Spondias mombin*. Figura 5.



2.7. Medida de la actividad estrogénica del extracto por competencia protéica.

En la misma forma como se describe en la publicación anterior (1) se midió la radioactividad desplazada por el extracto, sobre una curva de calibración construida con concentraciones crecientes de 17-beta-estradiol frío contra una actividad constante de 17-beta-estradiol marcado. (10, 11).

La actividad estrogénica encontrada para la *Spondias mombin* fué de 3,300 mcg/ml y de 1,900 mcg/ml de estrógenos expresados como 17-beta-estradiol, para concentraciones del extracto del 10% y del 5% respectivamente.

CONCLUSIONES

El estudio sobre los disturbios causados por *Spondias mombin* (jobo) en la reproducción del ratón, dá origen a las siguientes conclusiones:

1. El extracto acuoso de la *Spondias mombin* administrado por vía intraperitoneal y por vía oral, altera el ciclo estral de las ratonas.

2. La administración de una dosis única (equivalente a 0.25 g/kg de la corteza seca de la planta), varía en su efecto según la fase del ciclo cuando se inyecte (diestro, proestro, estro temprano, estro o post-estro), siendo más marcadas las alteraciones al inyectarse durante el diestro.

3. La administración de dosis continuas por vía intraperitoneal o por vía oral, causan disturbios en el ciclo estral que se prolongan por varios ciclos, aún después de suspendido el tratamiento y que se caracterizan por una marcada prolongación de la fase del diestro.

4. Se encontró una evidente disminución de la receptividad sexual en los ensayos por vía oral y por vía intraperitoneal, debido a los prolongados periodos de diestro. La fecundidad también se vió disminuída en un 86,7% para el ensayo por vía intraperitoneal y en un 50,0% para el ensayo por vía oral; no se observó disminución en el número de crías de las hembras que gestaron.

5. No se observó resistencia de los animales a los principios activos de la planta, después de un primer periodo de administración de los extractos por tres ciclos.

6. La administración del extracto de la planta en el post-coito (día 1 hasta el día 19), causa una marcada disminución de la fertilidad, debido probablemente a un impedimento en la implantación, por modificación de las condiciones uterinas o por aumento en la motilidad del oviducto. En tanto que la administración del extracto de la planta en el post-coito (día 10 hasta el día 19) no afecta la fertilidad, ni ejercer efectos abortivos o teratogénicos; esto confirma en parte que la interferencia con la fertilidad ocurre en los primeros días de la preñez.

7. Los efectos observados demuestran que la *Spondias mombin* presenta actividad estrogénica "in vitro"; medida por competencia proteica contra estradiol radioactivo, e "in vivo" y permiten deducir la presencia en esta planta de sustancias con efectos antifertilizantes prolongados y relativamente libres de efectos indeseables.

BIBLIOGRAFIA

1. SIERRA, N., BUCHELLI, F., OLARTE, J., GIL, A., Disturbios en la reproducción del ratón causados por "Helicteres baruensis". Rev. Col. Cienc. Quim. Farm, 4, No. 1, 5, octubre de 1983.
2. BUCHELLI, F., SIERRA, N., Disturbios en la reproducción del ratón causados por *Spondias mombin* y *Helicteres baruensis*. Tesis de grado para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional, Bogotá, 1979.
3. FARNSWORTH, N., BINGEL, A., CORDELLE, G., CRANE, F., and FONG, N., Potential value of plants as sources of new antifertility agents I, Journal of pharmaceutical Sciences, 64, 4, 541-546, Tabla II, abril 1975.
4. FARNASWORTH, N., BINGEL, A., CORDELL, G., CRANES, F., and FONG, N., Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. Journal Pharmaceutical Sciences, 64, 5, 718-729, Tabla VI, VII, May 1975.
5. GARCIA, B.H., Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica, Tomo I, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional Bogotá, 1975, 117.
6. GARCIA, B.H., Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica, Tomo II, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional, Bogotá, 1975, 137-139.
7. OSTEAU, L., GALLEGO, E., Contribución al estudio fitoquímico de la *Spondias mombin*, tesis de grado para optar al título de Químico Farmacéutico, Universal Nacional, Bogotá, 1981.
8. FARNSWORTH, N., BINGEL, A., CORDELL, G., CRANE, F., and FONG, N., Potential value of plants as sources of new Antifertility agents I. Journal Pharmaceutical Sciences, 64, 4, 583 Tabla V, abril 1975.
9. ROBERTS, R., The mouse, its reproduction and development, Burgess Publishing Company, Minneapolis 1968, 38-42.
10. CORKER, C., EXLEY, D., NAFTALIN, F., Assay of 17 beta estradiol by competitive proteins binding methods, Acta Endocrinologic Supl, 147., 305, 1970.
11. KOREMAN, S., Radio Ligand bending assay of specific estrogens using a soluble macromolecule, Journal Clin. Endocrinology, 28 127, 1968.