



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas**

**Respuesta inmune humoral y celular a la vacuna  
contra la hepatitis B en individuos sanos tratados con  
maca pulverizada (*Lepidium peruvianum* Chacón,  
ecotipo amarillo)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en  
Microbiología y Parasitología

**AUTOR**

Jenny Mariella QUISPE MASCCO

**ASESOR**

Libertad ALZAMORA GONZALES

Lima, Perú

2010



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Quispe, J. (2010). *Respuesta inmune humoral y celular a la vacuna contra la hepatitis B en individuos sanos tratados con maca pulverizada (Lepidium peruvianum Chacón, ecotipo amarillo)*. Tesis para optar el título de Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología. Escuela Académico Profesional de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

Asesora

**Dra. Libertad Alzamora Gonzales**

Profesora Principal de la Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

*A mis padres y mis hermanos por su gran  
apoyo, amor y comprensión en cada momento de mi  
vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi agradecimiento en primer lugar a la Dra. Libertad Alzamora Gonzales, por permitirme realizar la presente tesis, por su confianza en mi persona, por sus consejos y por el cariño brindado ya que todo ello marcó el inicio de mi vida profesional.

A todos los integrantes del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, al profesor Colona por su apoyo en la distribución de la dosis a los participantes de los grupos experimentales, a Ysabel León y Eric Mananita por su apoyo incondicional, amistad sincera y por los momentos de alegría compartidos.

A mis padres Francisco y Aquilina quienes me brindan su amor, apoyo y confianza durante toda la carrera universitaria y en mi vida profesional.

A mis hermanos Alfredo y Sebastián por todos los momentos compartidos y por el cariño que me brindan.

A la Dra. Maria Díaz Vera y al Dr. Guillermo Chía Chong del Hospital Rezola de Cañete por brindarme las facilidades para desarrollar parte de los experimentos de la presente tesis en las instalaciones del Laboratorio de Inmunología y Hematología del Hospital Rezola de Cañete.

Y a Dios sobre todas las cosas, por apoyar a mi familia en cada momento de la vida, por enseñarme a ser una mejor persona cada día y a ser una mejor profesional.

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>g</b>	Gramo
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>LTH</b>	Linfocitos T cooperadores
<b>LTC</b>	Linfocitos T citotóxicos
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>mM</b>	Milimolar

# CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>8</b>
I. METABOLITOS SECUNDARIOS Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón	<b>8</b>
II. VIRUS DE LA HEPATITIS B	<b>11</b>
III. VACUNACIÓN CONTRA LA HEPATITIS B	<b>14</b>
IV. INMUNOPOTENCIACIÓN	<b>15</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
I. PREPARACIÓN DE CÁPSULAS DE MACA	<b>18</b>
II. POBLACIÓN DE ESTUDIO	<b>18</b>
III. DISEÑO DEL ESTUDIO	<b>18</b>
IV. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL	<b>20</b>
1. Dosaje de anticuerpos anti-HBs por el método de ELISA	<b>20</b>
2. Determinación de la seroprotección y seroconversión	<b>22</b>
V. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR	<b>22</b>
1. Activación de células mononucleares de sangre periférica	<b>22</b>
2. Cuantificación de linfocitos CD4+ y CD8+	<b>23</b>
3. Cuantificación de leucocitos	<b>23</b>
VI. CUANTIFICACIÓN DE ERITROCITOS Y HEMOGLOBINA	<b>24</b>
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	<b>24</b>
<b>RESULTADOS</b>	
I. POBLACIÓN DE ESTUDIO	<b>25</b>
II. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL	<b>25</b>
1. Dosaje de anticuerpos anti-HBs	<b>25</b>
2. Seroconversión	<b>27</b>
3. Seroprotección	<b>28</b>
III. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR	<b>29</b>
1. Activación de células mononucleares de sangre periférica	<b>29</b>
2. Cuantificación de la población de linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+	<b>30</b>



3. Cuantificación de leucocitos	31
a. Leucocitos totales	31
b. Neutrófilos	33
c. Linfocitos	33
d. Monocitos, Eosinófilos y Basófilos	33
III. CUANTIFICACIÓN DE ERITROCITOS Y HEMOGLOBINA	34
1. Eritrocitos	34
2. Hemoglobina	35
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>53</b>

## RESUMEN

*Lepidium peruvianum* Chacón (Brassicaceae), también conocida como “maca”, es una planta medicinal que crece exclusivamente entre 4,000 y 4,500 msnm en los Andes del Perú, presenta diferentes ecotipos que varían de acuerdo al color de la raíz, que va desde el blanco al negro; en la actualidad es ampliamente usada por sus importantes propiedades nutritivas y medicinales relacionadas con la presencia de diversos metabolitos secundarios.

Para evaluar el efecto del tratamiento con maca sobre la respuesta inmune tanto humoral como celular se inmunizaron 70 personas voluntarias adultas y sanas con la vacuna contra el virus de la hepatitis B, Gene Vac B. Se formaron 2 grupos, uno se trató con maca pulverizada (3g/día) y el control fue tratado con placebo. Se aplicó un estudio aleatorio a doble ciego, todos los participantes recibieron las tres dosis de la vacuna de acuerdo al esquema de vacunación (0, 1, 6 meses) y durante 2 meses contados a partir de la primera dosis ambos grupos recibieron una dosis diaria de maca y placebo respectivamente.

Los objetivos del presente estudio fueron los siguientes: medir la producción de anticuerpos anti-HBs al 1, 2 y 6 meses, evaluar la seroconversión y seroprotección en ambos grupos; cultivar células mononucleares de sangre periférica para el estudio de la producción de óxido nítrico (NO), comparar el recuento diferencial de la población de linfocitos CD3+CD4+ (L<sub>T</sub> cooperadores) y CD3+CD8+ (L<sub>T</sub> citotóxicos) y finalmente realizar un hemograma a todos los voluntarios al mes y a los 2 meses de iniciado el tratamiento para el recuento de leucocitos, eritrocitos, neutrófilos, linfocitos, basófilos, eosinófilos y monocitos; así como también determinar los niveles de hemoglobina.

La producción de anticuerpos anti-HBs a 1, 2 y 6 meses en el grupo tratado con maca fue significativamente superior en comparación con el grupo control ( $p < 0.0001$ ). Todos los participantes de ambos grupos seroconvirtieron después de un mes de aplicada la primera dosis. Los porcentajes de seroprotección en el grupo tratado con maca fueron mayores comparados con el control ( $p = 0.034$ ), a su vez el tratamiento con maca favoreció la producción de óxido nítrico en comparación con el control ( $p < 0.0001$ ), también el recuento de linfocitos T cooperadores y citotóxicos aumentó en número en el grupo tratado con maca ( $p < 0.0001$ ). Se registró un incremento en el recuento de leucocitos

totales y neutrófilos pero este no fue significativo, contrariamente se produjo un incremento significativo del recuento de células mixtas (basófilos, eosinófilos y monocitos) ( $p < 0.0001$ ) en el grupo tratado con maca. Los recuentos de eritrocitos no fueron alterados por el tratamiento con maca, en el grupo tratado con maca se produjo un incremento significativo de la concentración de hemoglobina, sin afectar la cantidad de eritrocitos ( $p < 0.0009$ ).

**Palabras Clave:** *Lepidium peruvianum* Chacón, inmunopotenciación, hepatitis B, inmunoestimulación, maca, ELISA.

## ABSTRACT

*Lepidium peruvianum* Chacon (Brassicaceae), also known as maca, is a plant that grows exclusively between 4,000 and 4,500 masl in the Central Andes of Peru, this plant has different ecotypes that vary according to the color of the root, these range from white to black, in this plant is now widely used for their important nutritional and medicinal properties associated with the presence of various secondary metabolites present in the root.

To evaluate the treatment effect of maca on both humoral and cellular immune response 70 healthy adult volunteers were immunized with the vaccine against hepatitis B virus, Gene Vac B. Two groups were formed, one was treated with maca powder (3g/day) and a control group treated with placebo. We performed a randomized double-blind study; all participants received three doses of vaccine according to the vaccination schedule (0, 1, 6 months) and during 2 months after the first dose of both groups received a dose maca daily and placebo respectively.

The objectives of this study were: to measure the production of anti-HBs at 1, 2 and 6 months; to assess the seroconversion and seroprotection in both groups; to grow cultured peripheral blood mononuclear cells to study the production of nitric oxide (NO), comparing the differential account in the population of lymphocytes CD3+CD4+ (LT helper) and CD3+CD8+ (LT cytotoxic) and finally perform a blood count on all the volunteers after a month and 2 months of starting the treatment to assess the count of leukocytes, erythrocytes, neutrophils, lymphocytes, basophils, eosinophils and monocytes, as well as determining the hemoglobin levels.

The production of anti-HBs at 1, 2 and 6 months in the group treated with maca was significantly higher compared with the control group ( $p < 0.0001$ ) All participants in both groups seroconverted after a month of applying the first dose of vaccine, the seroprotection rates in the group treated with maca was higher compared to the control group value ( $p = 0.034$ ), which in turn helped maca treatment with nitric oxide production compared with control ( $p < 0.0001$ ), also the count of T helper and cytotoxic lymphocytes increased in the maca treated group ( $p < 0.0001$ ). Was an increase in the counting of leukocytes and neutrophils, but this was not significant; in contrast, there was a significant increase in the counting of mixed cells (basophils, eosinophils and monocytes) ( $p$

<0.0001) in the group treated with maca. The count of red blood cells was not altered by the treatment with maca, in the group treated with maca there was a significant increase in the concentration of hemoglobin, without affecting the amount of erythrocytes ( $p \leq 0.0009$ ).

**Keywords:** *Lepidium peruvianum* Chacón, immunopotential, hepatitis B, immunostimulation, maca, ELISA.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad se estima que alrededor del 80% de la población mundial recurre a la Medicina Tradicional como herramienta básica en la atención primaria de salud por lo que el uso de las plantas medicinales y el rol que deben cumplir en la medicina actual han sido determinadas por la Organización Mundial de la Salud desde 1978.

Actualmente los avances tecnológicos en la biotecnología, en la genómica, la bioinformática y la nanotecnología han multiplicado las posibilidades de encontrar nuevos compuestos y/o nuevas aplicaciones de muchas plantas medicinales.

Además los avances experimentados en la última década en la síntesis de péptidos recombinantes y la ingeniería genética ha hecho posible el desarrollo de las denominadas “vacunas de nueva generación” (Takx-kohlen, 1992); sin embargo, éstas vacunas diseñadas basándose en proteínas recombinantes solubles estimulan una buena respuesta inmune humoral, pero desarrollan una débil respuesta celular; esto probablemente se debe a la incapacidad de muchos de éstos antígenos de ser procesados y presentados a los linfocitos para generar una eficiente respuesta inmune frente a un antígeno extraño (Raychaudhuri y Morrow, 1993).

La aplicación de estas tecnologías en el diseño de nuevos antígenos, también ha generado la necesidad de desarrollar nuevos compuestos que mejoren la respuesta inmune, estos son denominados “inmunopotenciadores”, éstos son capaces de potenciar la respuesta inmune, deben ser eficaces en la estimulación de la respuesta humoral y celular; además deben estar desprovistos de propiedades biológicas adversas que impidan su uso en vacunas (Takx-Kohlen, 1992), actualmente se vienen desarrollando diversos estudios para la búsqueda de compuestos de origen natural que puedan mejorar la respuesta inmune frente a las vacunas de nueva generación (Vandepapeliere *et al.*, 2004).

Se han encontrado compuestos aislados de plantas y otros organismos que poseen la capacidad de incrementar la producción de anticuerpos y estimular significativamente la respuesta de los linfocitos T, éstos compuestos vienen siendo estudiados en ensayos pre-clínicos y clínicos combinados con vacunas recombinantes que presentan problemas en generar una adecuada respuesta inmune, mejorando la respuesta inmune humoral y/o celular.

*Lepidium peruvianum* Chacón conocida también con el nombre de *Lepidium meyenii* Walpers es llamada comúnmente “maca”, es el único miembro de la familia Brassicaceae domesticado en los Andes, que en la actualidad ha retomado la importancia que tuvo en el pasado, es una especie que reúne una excelente calidad alimenticia, alta productividad y adaptación a condiciones ecológicas muy frías donde otro cultivo no podría prosperar; crece exclusivamente entre 4,000 y 4,500 msnm en los Andes centrales peruanos y ampliamente usada debido a sus propiedades nutritivas, reconstituyentes, afrodisíacas, estimulantes de la fertilidad y por ser regulador natural de trastornos menstruales (Obregón, 1998), la actividad biológica de la planta está localizada en la raíz, éstas son hervidas y consumidas tradicionalmente como jugos (Valerio y Gonzáles, 2005).

Por consiguiente, el presente estudio aleatorio a doble ciego estudió la respuesta inmune humoral y celular a la vacuna contra la hepatitis B en individuos sanos tratados con maca; para ello, se determinó la producción de anticuerpos específicos, los porcentaje de seroconversión y seroprotección; así como también la producción de óxido nítrico en cultivos de células mononucleares de sangre periférica, cuantificación de leucocitos y de linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+; adicionalmente también se cuantificaron los eritrocitos y hemoglobina en todos los participantes del estudio.

Los objetivos planteados para este estudio fueron los siguientes:

### **Objetivo General**

Evaluar la capacidad inmunopotenciadora de la maca pulverizada (ecotipo amarillo) sobre la respuesta inmune humoral y celular en individuos sanos vacunados contra la hepatitis B.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar la producción de anticuerpos anti-HBs producidos por la vacunación contra el VHB en todos individuos tratados y no tratados con maca pulverizada.
2. Determinar los porcentajes de seroconversión y seroprotección en todos los individuos tratados y no tratados con maca pulverizada.

3. Determinar la producción de óxido nítrico en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos vacunados, tratados y no tratados con maca pulverizada.
4. Cuantificar las poblaciones linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+ y de leucocitos en individuos sanos vacunados, tratados y no tratados con maca pulverizada.
5. Cuantificar la población de eritrocitos y determinar la concentración de hemoglobina, analizando los hemogramas realizados a todos los individuos vacunados, tratados y no tratados con maca pulverizada.



## ANTECEDENTES

### I. METABOLITOS SECUNDARIOS Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE

#### *Lepidium peruvianum* Chacón

*Lepidium peruvianum* Chacón conocida también con el nombre de *Lepidium meyenii* Walpers es llamada comúnmente “maca” y es la única representante de la familia Brassicaceae que ha sido domesticada en los Andes centrales del Perú, su cultivo está restringido al departamento de Junín; en las localidades de Huayre, Carhuamayo, Uco, Ondores, Junín y Pasco, estas zonas están ubicadas a 4,000 y 4,450 msnm que corresponden al piso ecológico de la puna, la cual se caracteriza por tener temperaturas promedios entre 4 y 7°C, alta irradiación solar, frecuentes heladas, vientos fuertes y suelos ácidos (pH<5). Las raíces de maca que existen en la actualidad se diferencian por el color externo de la raíz, que puede ser blanco, amarillo, negro, rojo y morado denominándose a cada uno como ecotipos (Aliaga, 2000).

Crónicas españolas del siglo XVII describen el uso de maca por nativos de los Andes centrales peruanos para aumentar la fertilidad en humanos y animales. Es descrita brevemente en la parte I de la obra de Pedro Cieza de León de 1553 titulada “La Crónica General del Perú”. Vásquez De Espinoza, quien visitó el Perú en 1598, también proporciona una descripción corta de la maca en su “Compendio y Descripción de las Indias Occidentales”, y el Padre Bernabé Cobo, quien visitó el Perú entre 1603 y 1629, también lo incluye en su “Historia del Nuevo Mundo” (Ochoa y Ugent, 2001).

En cuanto al análisis de los compuestos químicos derivados del carbono, se ha encontrado que el tubérculo contiene concentraciones cercanas al 59% de carbohidratos, 10.2% de proteínas, 8.5% de fibra, y poco más de 2.2% de lípidos (Dini *et al.*, 1994). Asimismo, las vitaminas B1, B2, C y E se encuentran disponibles en concentraciones que van desde 0,20 mg hasta 87,0 mg (Obregón, 1998). El contenido proteico de esta raíz se manifiesta principalmente bajo la forma de cadenas polipeptídicas y aminoácidos, encontrándose presentes entre estos últimos 20 de los cuales 8 son considerados “esenciales”, aquellos aminoácidos que el organismo humano no puede sintetizar y por ello deben ser incorporados necesariamente en la dieta diaria, adicionalmente, aminoácidos tales como ácido glutámico, ácido aspártico, serina, glicina, alanina,

fenilalanina, valina, tirosina, leucina, arginina, y treonina, se encuentran en esta planta en cantidades significativas (Dini *et al.*, 1994).

Los estudios fitoquímicos también revelan la presencia de metabolitos secundarios; estos compuestos no tienen una función reconocida en el mantenimiento de los procesos fisiológicos fundamentales de las plantas que los sintetizan, entre las funciones que cumplirían estos metabolitos están: proteger a la planta de los depredadores, atraer polinizadores y brindar protección contra diferentes tipos de estrés a los que se ven sometidas.

Chacón (1961) observó en un estudio en ratas la maduración de los folículos de Graff así como también el incremento de la producción de estrógenos, y lo atribuyó a la presencia de las fracciones alcaloidales encontradas en los extractos acetónico, etéreo y alcohólico de maca. Mucho después Chacón (1990) al realizar el estudio de los extractos alcaloideos halló cuatro alcaloides a los que denominó macaína 1, 2, 3 y 4.

Yllescas *et al.*, (1994) en el estudio fitoquímico de la planta encontraron 3 alcaloides en los extractos metanólico y butanólico de maca de los ecotipos amarillo, rojo y negro. En 1993, Garró *et al.*, obtuvieron cuatro fracciones alcaloidales empleando cromatografía de capa fina. Por otro lado Dini *et al.*, (1994) mediante cromatografía de capa fina (realizado en condiciones alcalinas) de un extracto clorofórmico de maca detectaron tres fracciones positivas al reactivo de Dragendorff, agente revelador de compuestos alcaloidales cuya aplicación produce un color naranja. Muhammad *et al.*, (2002) reportó en el estudio fitoquímico de maca la presencia del alcaloide 1,2-dihidro-*N*-hidroxipiridina a la que denominó Macaridina y también otras moléculas como, alcalmidas benziladas a las que denominó Macamidias (*N*-bencil-5-oxo-6*E*, 8*E*-octadecadiamida y *N*-bencilhexadecanamida) una clase distinta de metabolito secundario reportado sólo en *Lepidium meyenii* Walp. Cui *et al.*, (2003), además identificaron dos alcaloides imidazólicos a las cuales denominaron Lepidilina A (1,3-dibenzilado-4,5-dimetilimidazol clorato) y Lepidilina B (1,3-dibenzilado-2,4,5-trimetilimidazol clorato).

La presencia de otras moléculas como los glucosinolatos también han sido reportadas en estudios fitoquímicos; éstas moléculas son una clase de tioglucósidos que son almacenados en diferentes tejidos de la planta y son una fuente significativa de azufre, se les encuentran junto con la enzima la mirosinasa que los degradan a isotiocianatos,

nitrilos, cianoepitioalcanos y tiocianatos (Iori *et al.*, 1996). Zheng *et al.*, (2000) trabajó con los extractos metanólico y etanólico de *Lepidium meyenii* Walp y reportó algunas macamidas, macaínas, ácidos grasos y esteroides así como también la presencia de benzil isotiocianatos determinados por espectrofotometría de masas. Dini *et al.*, (2002) identificaron dos glucosinolatos en el extracto metanólico de raíces de *Lepidium meyenii* Walp, un bencilglucosinolato (glucotropaeolin) y otra molécula que denominaron *m*-metoxibencilglucosinolato.

El estudio llevado a cabo por Dini *et al.*, (1994) también reveló que la maca es un importante depósito de ácidos grasos (linoleico, palmítico y oleico, entre otros), saponinas, taninos y alcaloides, los cuales actúan como una importante fuente energética y estructural; la maca también contiene esteroides, tales como campesterol, estigmasterol y sitosterol (Zheng *et al.*, 2000).

En cuanto a sus propiedades biológicas varios autores han reportando diversas propiedades tanto en estudios *in vivo* como *in vitro* del tratamiento con maca; los primeros reportes fueron dados por la Dra. Gloria Chacón quien desde 1961 viene reportando en sus estudios los efectos del tratamiento con maca sobre la fertilidad, en uno de éstos inoculó extracto alcaloideo de maca en ratas, obteniendo una marcada estimulación de la maduración de los folículos de Graff además del engrosamiento del endometrio.

Otros autores han reportado el incremento en el número de espermatozoides y el efecto de la maca sobre el comportamiento sexual (Zheng *et al.*, 2000; Cicero *et al.*, 2002), estudios realizados en ratas con tres ecotipos de maca (rojo, amarillo y negro) sobre la motilidad de espermatozoides demostró que el tratamiento con el ecotipo negro incrementa la motilidad de éstos (Rubio *et al.*, 2006, González *et al.* 2001a). González *et al.*, (2001b) demuestran que el tratamiento en humanos mejora el recuento y motilidad de espermatozoides y tiene efecto afrodisíaco en varones adultos; además se reporta que los cambios hormonales (producción de testosterona) son independientes al tratamiento con maca pues no se observó variaciones significativas producto del tratamiento con maca. Se reporta también que la maca presenta un efecto favorable en el tratamiento de la osteoporosis en un modelo de ratas ovariectomizadas al mejorar la densidad ósea y restaurar la red trabecular de las ratas tratadas con maca (Zhang *et al.*, 2006).

Otros estudios demostraron una actividad antioxidante de la maca, por su capacidad de atrapar los radicales libres y proteger a las células contra el estrés oxidativo (Sandoval *et al.*, 2002), su actividad antitumoral en ratones tratados con ciclofosfamida (Alzamora, 2003) y el efecto inmunomodulador sobre la respuesta celular y humoral en ratones tratados con extracto metanólico de cuatro ecotipos de maca: blanco, morado, rojo y negro (Alvarez, 2008, Alzamora *et al.*, 2007a, Alzamora *et al.*, 2007b).

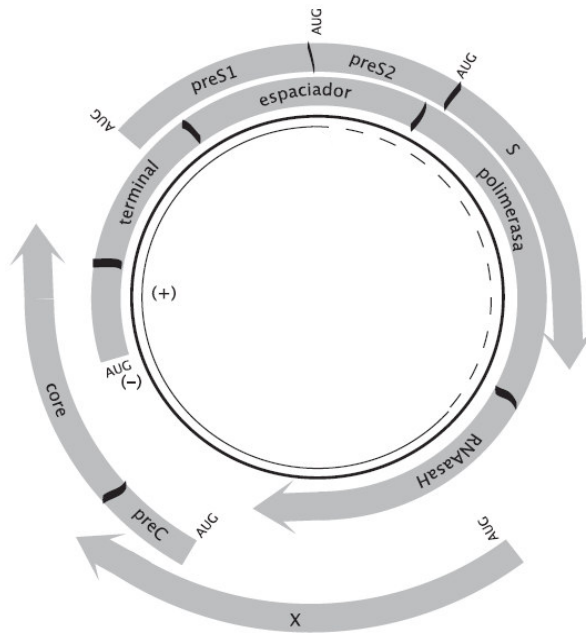
## II. VIRUS DE LA HEPATITIS B

El virus de la hepatitis B (VHB) pertenece a la familia *Hepadnaviridae*, género *Orthohepadnavirus* se caracteriza por ser un virus de ADN circular de doble cadena, el cual se replica a través de un ARN intermediario mediante transcripción reversa (Ganem y Procesi, 2004).

La partícula viral madura está compuesta de una nucleocápside rodeada por una bicapa lipídica en la cual se incorporan las proteínas de la envoltura, dentro de la nucleocápside se encuentra el genoma viral que contiene toda la información genética del virus (Ganem y Procesi, 2004).

El genoma del VHB está constituido por un DNA de aproximadamente 3,200 pb, varía un poco dependiendo del genotipo y se caracteriza por que una de sus cadenas es más pequeña que la otra. Se divide en cuatro regiones principales, los marcos abiertos de lectura (ORF) están sobrepuestos entre sí: S, C, P y X. Estos ORF's tienen genes que codifican las proteínas de la envoltura viral (HBsAg), la proteína de la cápside (HBcAg), el antígeno E (HBeAg), la polimerasa y la proteína X. Todas las bases del ADN del genoma; participan en la codificación de al menos una proteína del virus (Ganem y Procesi, 2004) (Figura 1).

El VHB presenta tropismo por el hígado; pero también puede infectar al bazo, páncreas y células mononucleares; *in vivo*, el hígado es el principal órgano de replicación del virus. Las consecuencias de este tropismo por el hígado propician el desarrollo de severas patologías como insuficiencia hepática crónica, cirrosis y carcinoma hepatocelular (Ganem y Procesi, 2004).

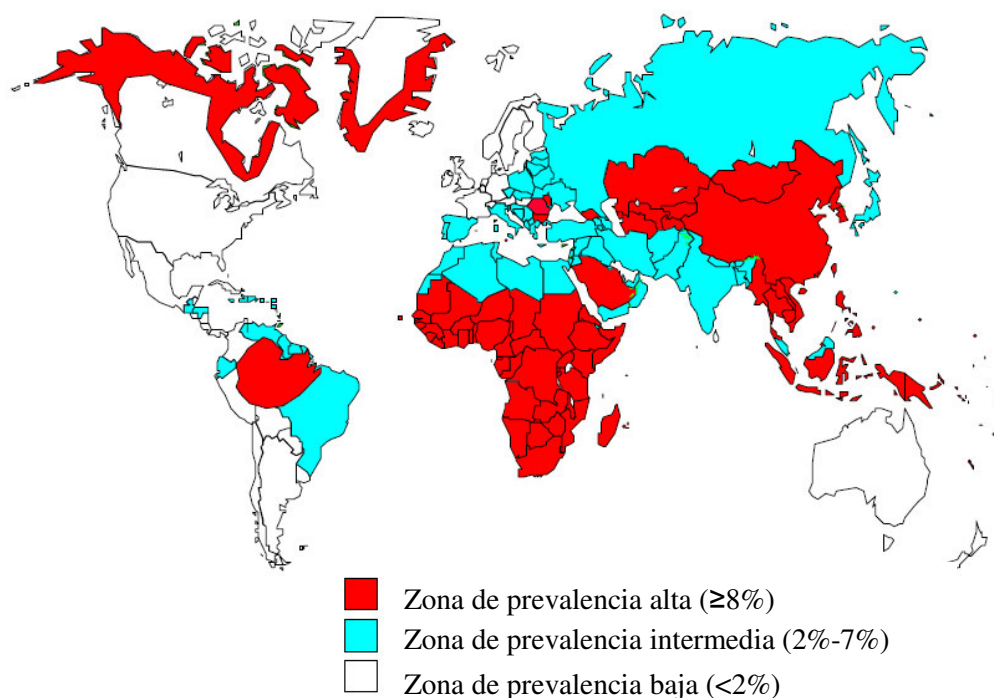


**Figura 1.** Genoma del virus hepatitis B dividido en 4 regiones principales: región S, constituida por las regiones pre-S1, pre-S2 y el gen S; región C, constituida por la región pre-C y gen C; la región P, esta región codifica la polimerasa viral y la región X, codifica la proteína X (Sánchez y Panduro, 2005).

## Z

Actualmente 2,000 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas con el VHB y de este número 350 millones corresponden a portadores asintomáticos, cada año cerca de 4 millones de nuevos casos son reportados a nivel mundial, siendo el 25% estos pacientes portadores asintomáticos; y debido a la activación de la hepatitis crónica, cirrosis o cáncer de hígado se producen alrededor de un millón de muertes cada año (OMS, 2002).

Cerca del 75% de la población mundial vive en áreas donde existen altos índices de infección por el VHB. El mundo se ha dividido en tres zonas de prevalencia de hepatitis B: alta (>8%), intermedia (2-8%), y baja (<2%). Las áreas de mayor prevalencia incluye Sudeste Asiático y Archipiélago del Pacífico excluyendo Japón, Australia y Nueva Zelanda; África Subsahariana, Cuenca del Amazonas, partes de Oriente Medio, República Central de Asia y algunos países en el este de Europa. En estas áreas, cerca del 70-90% de la población se infecta con el VHB antes de los 40 años, y del 8-20% de la población son portadores del VHB. En países como China, Senegal, Tailandia, los porcentajes de infección son muy altos en infantes y continúa en la niñez a esa edad la prevalencia de HBsAg en suero excede el 25%. Áreas de baja prevalencia incluyen Norte América, Norte y Sur de Europa, Australia y partes de Sudamérica. En estos países el porcentaje de portadores es bajo (>2%) y menos del 20% de la población se encuentra infectada con el VHB (Cabezas, 2002).



**Figura 2.** Distribución geográfica del virus de la hepatitis B (OMS, 2001).

El Perú está ubicado entre los países de prevalencia intermedia para el VHB, con una prevalencia para el HBsAg entre 1-2% y de 20-30% para anticuerpos contra HBcAg; sin embargo, por su variada geografía, hábitat y grupos de población, la distribución del VHB en nuestro país no es uniforme, existiendo marcadas diferencias entre las distintas regiones y departamentos. Es así que, en zonas de la selva, la prevalencia oscila entre 2% y 29%; en la costa entre 0.2% y 2%, mientras que en la sierra la prevalencia es baja; con excepción de Abancay, Huánuco y Ayacucho departamentos en donde la prevalencia alcanza el 16% (Cabezas, 2002) (Figura 2).

En el mundo la hepatitis B es la más importante enfermedad prevenible por inmunización, con el conocimiento de su estructura genómica, fue posible desarrollar la primera vacuna recombinante la cual es muy efectiva y los efectos colaterales que se puedan presentar son mínimos, como consecuencia la vacuna para la prevención del VHB ha sido adoptada en la inmunización universal en más de 100 países (Lee, 1997).

Además el desarrollo de nuevas estrategias de prevención de la hepatitis B actualmente deben incluir la inmunización universal de los recién nacidos, así como la prevención de la transmisión perinatal y nosocomial, la vacunación en edades críticas son fundamentales para interrumpir la transmisión del VHB. En muchos países la

implementación de programas de vacunación contra la hepatitis B ha llevado a una reducción dramática de los índices de infección en áreas endémicas (Regev, 2000).

### III. VACUNACIÓN CONTRA LA HEPATITIS B

La vacunación masiva contra la hepatitis B fue inicialmente recomendada solamente para zonas de alta prevalencia pero actualmente ha sido propuesta por la OMS como obligatoria en muchos programas nacionales de vacunación a nivel mundial pues se ha demostrado que sólo mediante la vacunación se podrá controlar esta epidemia y finalmente tratar de erradicar al virus.

Actualmente, las vacunas disponibles contra la hepatitis B están compuestas de preparaciones de HBsAg altamente purificados, obtenidos a partir del plasma de personas con infección crónica (llamadas vacunas derivadas de plasma) o a partir de plásmidos que contienen el gen que codifica el HBsAg que son insertados en el material genético de células de levaduras o de mamíferos (Leroux-Roels *et al.*, 1997).

La eficacia de la vacunación contra la hepatitis B está directamente relacionada con el desarrollo de anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis B (anti-HBs). Las personas quienes desarrollan títulos de anti-HBs >10 mUI/mL después de un esquema de vacunación que incluye de dos a tres dosis, están protegidos contra la enfermedad clínica y la infección crónica. A pesar de que las vacunas disponibles comercialmente contra la hepatitis B han demostrado alta eficacia protectora, se ha descrito que aproximadamente entre 4 a 10% de los adultos sanos inmunocompetentes, no producen niveles protectores de anti-HBs (Desombere *et al.*, 2000). Este grupo de individuos incluyen no respondedores y bajos respondedores, quienes son incapaces de producir niveles detectables (>1 mUI/mL) o protectores (10 mUI/mL) de anti-HBs, respectivamente.

El mecanismo responsable de esta respuesta inapropiada a la vacunación aún es desconocido. Se ha sugerido la presencia de un defecto en la presentación antigénica de ciertos antígenos del sistema mayor de histocompatibilidad (MHC). Los individuos homocigotos para HLA-DRB1\*0701 y DQB1\*0202 fallan en producir niveles mayor o iguales a 10 mUI/mL de anti-HBs, mientras que los individuos heterocigotos requirieron

más de 10 mg/mL de la vacuna utilizada para obtener una respuesta apropiada (McDermott *et al.*, 1999).

En otro estudio más reciente se demostró que el reconocimiento del HBsAg está restringido por los alelos DRB5\*0101, DRB1\*0301, DRB1\*1201, DPB1\*02012, DPB1\*0402 y DPB1\*0901 (Desombere *et al.*, 2000). Se ha demostrado además la existencia de repertorios de linfocitos T y B defectuosos, los cuales pudieran ser susceptibles a la destrucción de clonas específicas para el HBsAg mediada por linfocitos T citotóxicos. También se ha propuesto como mecanismo para explicar la ausencia de una respuesta a la vacunación, la tolerancia inmunitaria y defectos funcionales en la cooperación dependiente de los linfocitos T CD4+, necesaria para la producción de inmunoglobulinas por los linfocitos B (Esser *et al.*, 2002).

Para controlar la infección con el VHB se diseñaron vacunas, las primeras vacunas disponibles comercialmente fueron aquellas derivadas del plasma de portadores de VHB, cuyo uso fue aprobado en EEUU en 1982 y que demostraron tener una evidente eficacia, pero un alto costo de producción. Por estos problemas, estas vacunas han sido reemplazadas por las vacunas producidas por tecnología del ADN recombinante, para la inmunización contra el VHB (Vandervelde y Mortimer, 1985).

La primera vacuna recombinante fue introducida en 1986 en EEUU. Aunque existen diferentes vacunas producidas con tecnología de ADN recombinante, pueden usarse de forma intercambiable, y en la actualidad existen al menos 10 vacunas recombinantes contra el VHB que han sido fabricadas para la inmunización preventiva de la infección con el VHB alrededor del mundo (Vandervelde. y Mortimer, 1985).

#### **IV. INMUNOPOTENCIACIÓN**

Los inmunopotenciadores son sustancias que tienen la capacidad de incrementar la respuesta inmune, se les atribuyen funciones importantes en las inmunodeficiencias de algunos tipos de infecciones virales y bacterianas, especialmente usados en el tratamiento del cáncer, cuando las radiaciones y los medicamentos anticancerosos rompen el equilibrio del sistema inmune.



A los usos antes mencionados se une la posibilidad de potenciar también la inmunogenicidad de vacunas elaboradas con antígenos sintéticos, actuando a diferentes niveles del sistema inmune e incrementando selectivamente poblaciones o subpoblaciones de células tales como linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y citotóxicas, incrementando al mismo tiempo la producción de mediadores solubles como las citoquinas (Morris, 1999).

Se han descubierto nuevos compuestos con actividad inmunopotenciadora de origen natural, compuestos como el QS21, una saponina natural derivada de la corteza de la planta *Quillaja saponaria* Molina, este compuesto induce la generación de células T CD8+ y células citotóxicas, células Th1 y una respuesta humoral del tipo IgG2a en ratones (Liu *et al.*, 2002).

También se ha descrito la actividad del compuesto Tomatine, basado en un glicoalcaloide llamado Licopersin, el cual es obtenido a partir de las hojas secas de la especie silvestre de tomate *Lycopersicon pimpinellifolium*, este glicoalcaloide tiene una actividad similar a la que presentan las saponinas teniendo grandes posibilidades de ser un potente inmunopotenciador (Yang *et al.*, 2002).

En el estudio realizado por Khajuria *et al.*, (2006) se reporta la actividad inmunopotenciadora de la fracción RLJ-NE-299<sup>a</sup> aislada de los rizomas de la planta *Picrorhiza kurroa* Royle, esta fracción tiene la capacidad de incrementar el título de anticuerpos contra antígenos proteicos solubles, encontrándose que esta respuesta es muy superior a la que produce solamente el antígeno inoculado.

Compuestos con propiedades inmunopotenciadoras obtenidos de microorganismos también están siendo estudiados, entre ellos se encuentran compuestos derivados de bacterias, levaduras (glucanos) y algas. En bacterias se ha demostrado que el ADN bacteriano presenta propiedades inmunopotenciadoras incluyendo la capacidad de inducir la activación de las células *Natural Killer* (NK) y la inducción de citoquinas como el Interferón  $\alpha/\beta$  y  $\gamma$  (Halpern *et al.*, 1996). Tamura *et al.*, en 1996, notifican en sus estudios realizados en ratones, la utilidad de 2 derivados del dipéptido murámico (MDP) como inmunopotenciadores para su uso con la vacuna recombinante de la hepatitis B; la producción de anticuerpos anti-HBs obtenida con los derivados de MDP resultó mayor a la inducida por la vacuna adsorbida en alumbre.

El compuesto AS02A constituido por la emulsión de MLP<sup>®</sup>, monofosforil lípido A y QS-21, fue administrado conjuntamente con el HBsAg en personas adultas saludables encontrándose una mayor producción de anticuerpos específicos anti-HBs en comparación a la vacuna sin el compuesto AS02A (Leroux-Roels *et al.*, 1997).

El adyuvante AS04 contiene MLP<sup>®</sup>, monofosforil lípido A, esta forma del lípido A no tiene efectos tóxicos a diferencia de la forma nativa, este compuesto fue formulado por el laboratorio Glaxo Smith Kline Biologicals y es usado para el desarrollo experimental de una nueva vacuna contra hepatitis B llamada HB-AS04 (Boland *et al.*, 2004).

El hongo *Agaricus blazei* Murill, que proviene de la región montañosa de Sao Paulo en Brasil, es particularmente rico en polisacáridos y sus estudios en ratones frente a tumores han demostrado su actividad antitumoral, ya que se ha encontrado una mayor actividad de LC necesarios para la eliminación de células cancerígenas en los ratones tratados con esta planta (Ebina *et al.*, 1998).

Además de los estudios que indican actividad antitumoral de los polisacáridos contenidos en *Agaricus blazei* Murill, se ha encontrado también que incrementa el título de anticuerpos formados en respuesta a vacunas ADN, se ha empleado la información de la proteína de la cápside del virus de la hepatitis B (HBcAg) y los resultados obtenidos indican que los polisacáridos de *Agaricus blazei* Murill coinjectados con vacuna ADN-HBcAg incrementa la respuesta celular y humoral frente al HBcAg proponiéndolo como inmunopotenciador para vacunas ADN en modelos *in vivo* (Nakajima *et al.*, 2002).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **I. PREPARACIÓN DE CÁPSULAS DE MACA**

Para el estudio se utilizaron raíces de *Lepidium peruvianum* Chacón del ecotipo amarillo, éstas fueron colectadas en la localidad de Carhuamayo ubicada a 4,200 msnm en el departamento de Junín en el mes de Marzo del 2006.

Las raíces de maca fueron lavadas y secadas a temperatura ambiente durante 24 horas, luego todas las raíces se cortaron en trozos muy pequeños que fueron colocados en una estufa de aire circulante a 45°C para su secado durante 48 horas, luego los trozos deshidratados fueron pulverizados en una licuadora y tamizados hasta obtener un polvillo muy fino (Alzamora, 2003), este pulverizado fue encapsulado bajo estrictas condiciones de esterilidad cada 500 mg por cápsula.

### **II. POBLACIÓN DE ESTUDIO**

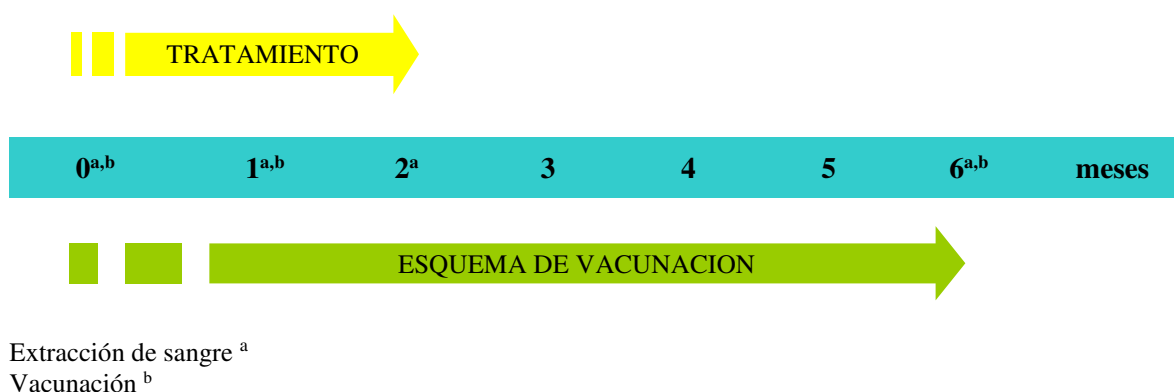
Fueron elegidos 70 adultos sanos, mujeres y hombres entre 18-52 años quienes participaron de manera voluntaria, previo al inicio del estudio se les practicaron exámenes serológicos para conocer si eran negativos para los siguientes marcadores serológicos presentes en la infección con el VHB: HBsAg, anti-HBsAg y anti-HBc. Se excluyeron del estudio a los participantes que tuviesen algún antecedente de enfermedad hepática, renal, cardíaca, respiratoria, alérgica o cualquier enfermedad crónica, de igual manera tampoco participaron mujeres embarazadas o que estén en período de lactancia y tampoco aquellos que estén consumiendo algún suplemento dietético con propiedad inmunoestimuladora.

### **III. DISEÑO DEL ESTUDIO**

Se realizó un estudio prospectivo aleatorio a doble ciego, todos los participantes firmaron una ficha de consentimiento y luego fueron distribuidos en dos grupos denominados Grupo Maca (GM) y Grupo Control (GC). Para evaluar la respuesta inmune producida por el consumo de maca se estableció una dosis de 3 g diarios distribuidos en 6 cápsulas cada una con 500 mg de maca pulverizada. El placebo consistió en azúcar impalpable en la misma cantidad y dosis que la maca pulverizada. Una vez iniciado el estudio se distribuyó diariamente a cada integrante las cápsulas correspondiente al grupo

de tratamiento que pertenecían, los participantes acudían en las mañanas y se verificaba visualmente el consumo total de la dosis así como también se realizaba una breve entrevista acerca de alguna reacción adversa o malestar asociado a la ingesta de las cápsulas y sus contenidos; y se anotaba en un reporte diario la entrega de las cápsulas.

El protocolo de tratamiento se inició con la primera dosis de la vacuna y se llevo a cabo durante los dos meses siguientes. La segunda dosis de la vacuna se aplicó 1 mes después de iniciado el tratamiento y el tratamiento prosiguió por 1 mes más. Los participantes recibieron la tercera dosis seis meses después de haber recibido la primera dosis de acuerdo al esquema de vacunación (Figura 3).



**Figura 3.** Protocolo de tratamiento, esquema de vacunación y extracción de las muestras de sangre para las evaluaciones serológicas y hematológicas.

Se empleó para el estudio la vacuna comercial Gene Vac B elaborada en el Serum Institute de la India LTD. que contiene 20  $\mu\text{g/mL}$  de HBsAg al 95% de pureza adsorbido en hidróxido de aluminio a una concentración de 0.5 a 0.8 mg. El antígeno HBsAg purificado fue producido usando como sistema de expresión a la levadura *Hansenula polimorfa*, este procedimiento fue desarrollado originalmente por Rhein Biotech GMBH (Dusseldorf, Alemania), la transformación de la levadura para la producción de la vacuna consistió en inserción un vector de expresión que contiene la secuencia génica para la síntesis de proteína S, en el ADN de la levadura, la codificación de la proteína S está bajo el control de un promotor inducible por metanol, generando así en su presencia altas concentraciones intracelulares de HBsAg no glicosilado (3-7% del total de proteínas celulares) los cuales se ensamblan en partículas lipoproteicas de 20 nm.

La vacunación consistió en la administración por vía intramuscular en el músculo deltoides de tres dosis con la vacuna recombinante empleada. Cada dosis contiene 20  $\mu\text{g}$

de HBsAg adsorbidos en 0.5 mg a 0.8 mg de Hidróxido de Aluminio ( $Al^{+++}$ ) y como preservante 0.05mg de timerosal, todo ello en un volumen total de 1 mL.

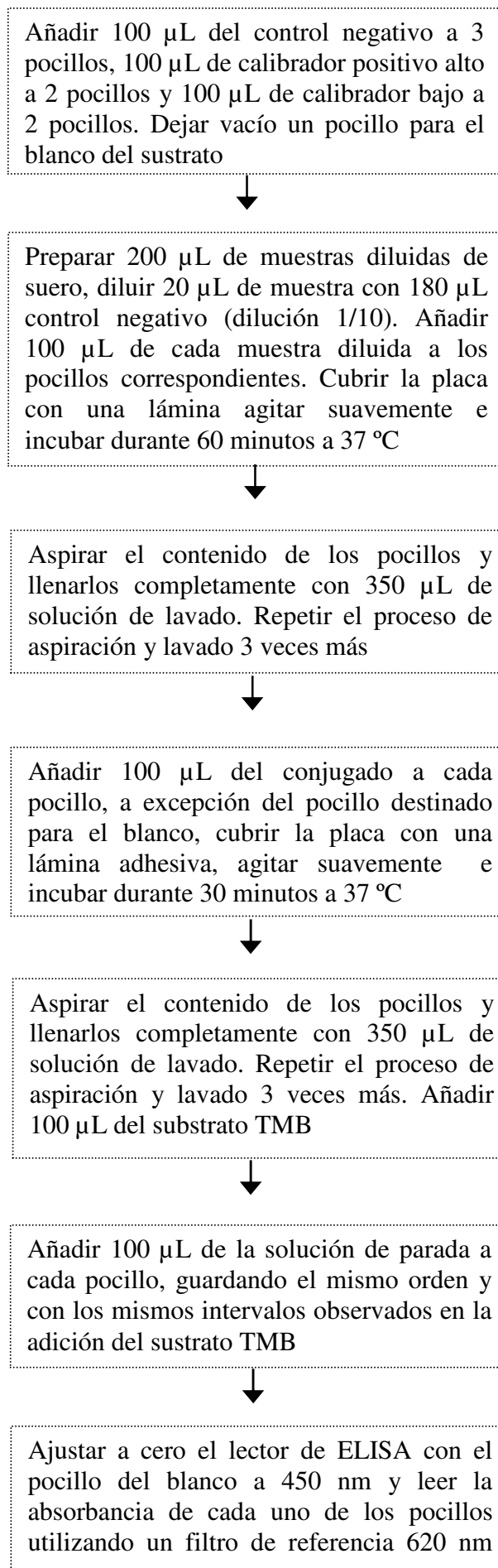
Las muestras de sangre para el dosaje de anticuerpos anti-HBs fueron extraídas al inicio, a 1 mes, 2 meses y 6 meses; cuantificación de eritrocitos, leucocitos y hemoglobina se realizó al inicio, al 1 mes y a los 2 meses de iniciado el tratamiento (Figura 3). La cuantificación de linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+ y el estudio de la producción de NO se realizaron en una muestra por grupo de tratamiento (29% /grupo) a los 2 meses de iniciado el tratamiento.

#### **IV. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL**

##### **1. Dosaje de anticuerpos anti-HBs**

El dosaje de anticuerpos se determinó mediante la técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay), ésta es ampliamente usada para la detección y cuantificación de anticuerpos contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti-HBs) en suero humano, se trabajó con el Kit ELISA anti-HBs, según las recomendaciones de fabricante (BIOKIT, Barcelona España) y se utilizó un Lector de ELISA Sunrise™ (Tecan Trading AG, Switzerland).

La ELISA anti-HBs es un método inmunoenzimático directo, de tipo “sandwich”, cada muestra de suero obtenida de los individuos tratados y no tratados con maca fueron incubadas en los pocillos de una microplaca, éstos se encuentran recubiertos con el HBsAg purificado. Si la muestra contiene anticuerpos anti-HBs, éstos se unirán específicamente al HBsAg que recubre el pocillo. Después del lavado de cada pocillo se añade el conjugado con peroxidasa, que se une con el complejo antígeno-anticuerpo formado en la primera incubación. Después de esta segunda incubación y posterior al lavado se añade una solución de sustrato enzimático y cromógeno; peróxido de hidrógeno y 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) respectivamente. Esta solución desarrollará un color azul si la muestra contiene anti-HBs. El color azul cambia a amarillo después de parar la reacción con ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ , 1N) y la intensidad del color desarrollado será proporcional a la concentración anticuerpos en la muestra (Figura 4).



**Figura 4.** Protocolo de realización de la prueba ELISA.

La concentración de anticuerpos se calculó utilizando la ecuación de regresión lineal obtenida de la curva de calibración, se elaboró una representación gráfica de las coordenadas X y Y colocando en las abscisas (eje de las X) las concentraciones de anti-HBs del control negativo (0 mUI/mL), del calibrador positivo bajo (10 mUI/mL) y del calibrador positivo alto (100 mUI/mL), y en las ordenadas (eje de las Y) los correspondientes valores de absorbancia obtenidos para los mismos. La concentración de anti-HBs de cada muestra analizada se obtuvo a partir de su absorbancia.

## **2. Determinación de la seroprotección y seroconversión**

La producción de anticuerpos específicos anti-HBs en la actualidad es el principal marcador indicativo de inmunidad frente a la infección o vacunación contra el VHB. El uso de la vacuna ha aumentado la utilidad de determinar anti-HBs, ya sea en el tamizaje, en la pre-inmunización o en la monitorización de la seroconversión después de la vacunación.

Se realizó el análisis de la seroconversión considerando que esta condición está dada por la concentración sérica de anti-HBs  $\geq 1$  mUI/mL y el análisis de la seroprotección dada por la concentración sérica de anti-HBs superior a 10 mUI/mL.

## **V. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR**

### **1. Activación de células mononucleares de sangre periférica**

Los monocitos/macrófagos son células versátiles que forman parte de la respuesta inmune inespecífica contra diferentes microorganismos. Una vez activados pueden generar grandes cantidades de óxido nítrico (NO) a partir de L-arginina por acción de la sintasa de NO inducible (iNOS, del inglés *inducible nitric oxide synthase*). El NO es un mediador celular de múltiples funciones biológicas, incluyendo citotoxicidad mediada por macrófagos, destrucción de partículas fagocitadas, neurotransmisión y relajación del músculo liso.

La determinación de NO se realizó de manera indirecta a través de la cuantificación de nitritos acumulados en el sobrenadante de los cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Para ello, se cultivó por triplicado sangre total de individuos tratados y no tratados con maca (todos ellos vacunados) durante 18

horas a 37°C, el control consistió en la sangre total de individuos no tratados con maca y vacunados, al terminar el período de incubación, se obtuvieron 100 µL del sobrenadante de cada cultivo y se determinaron los nitritos presentes usando 100 µL del Reactivo de Griss, se midió la absorbancia de la mezcla a 540 nm con un espectrofotómetro de microcelda (UNICO 1100 Spectrophotometer), la concentración de nitritos se determinó usando una curva patrón elaborada con nitrito de sodio (NaNO<sub>2</sub>) (500 mM) como estándar.

## **2. Cuantificación de la población de linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+**

Los linfocitos T participan directamente en la respuesta inmune regulando la actividad de otras células mediante la secreción de citoquinas. En función a las distintas moléculas de superficie, los linfocitos T se pueden clasificar en diferentes tipos, el fenotipo CD3+CD4+ corresponde a los linfocitos T cooperadores (L<sub>T</sub>H) y el fenotipo CD3+CD8+ corresponde a los linfocitos T citotóxicos (L<sub>T</sub>C).

La diferenciación y cuantificación de las poblaciones de linfocitos se realizó por citometría de flujo (BD FACS Calibur) usando el software MultiSet V2.2, se obtuvo una muestra de sangre por punción venosa y se trató con el anticoagulante EDTA. Para ello, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-CD4 marcado con ficoeritrina (PE) y anti-CD8 marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

## **3. Cuantificación de leucocitos**

Las muestras de sangre se extrajeron por punción venosa y se colectaron en tubos con EDTA, luego fueron procesadas mediante un analizador hematológico automatizado (Sysmex KX 21 N), se realizó el recuento de leucocitos totales y se diferenciaron de las poblaciones de neutrófilos, linfocitos, basófilos, eosinófilos y monocitos.



## **VI. CUANTIFICACIÓN DE ERITROCITOS Y HEMOGLOBINA**

Al igual que la cuantificación de leucocitos se obtuvieron muestras de sangre por punción venosa y se trató con EDTA. Para la cuantificación de eritrocitos y hemoglobina se utilizó un analizador hematológico automatizado (Sysmex KX 21 N).

## **VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS (versión 16). Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  desviación estándar y las diferencias entre los grupos se determinaron mediante el análisis de varianza Levene seguido de la prueba T de Student, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . La comparación de la seroprotección entre los grupos de tratamiento fue realizada usando la Prueba del Chi-cuadrado a un nivel de significancia del  $p < 0.05$ .

# RESULTADOS

## I. POBLACION DE ESTUDIO

Todos los voluntarios recibieron tres dosis de la vacuna comercial Gene Vac B de acuerdo al esquema estándar de vacunación (0,1 y 6 meses). Participaron en el estudio un total de 70 voluntarios que fueron distribuidos al azar en 2 grupos (35 voluntarios/grupo), los grupos fueron denominados Grupo Maca (GM) y Grupo Control (GC). No se observó diferencias significativas en la edad promedio entre GC y GM, de igual manera en la edad promedio de las mujeres y de los varones entre GC y GM (Tabla 1).

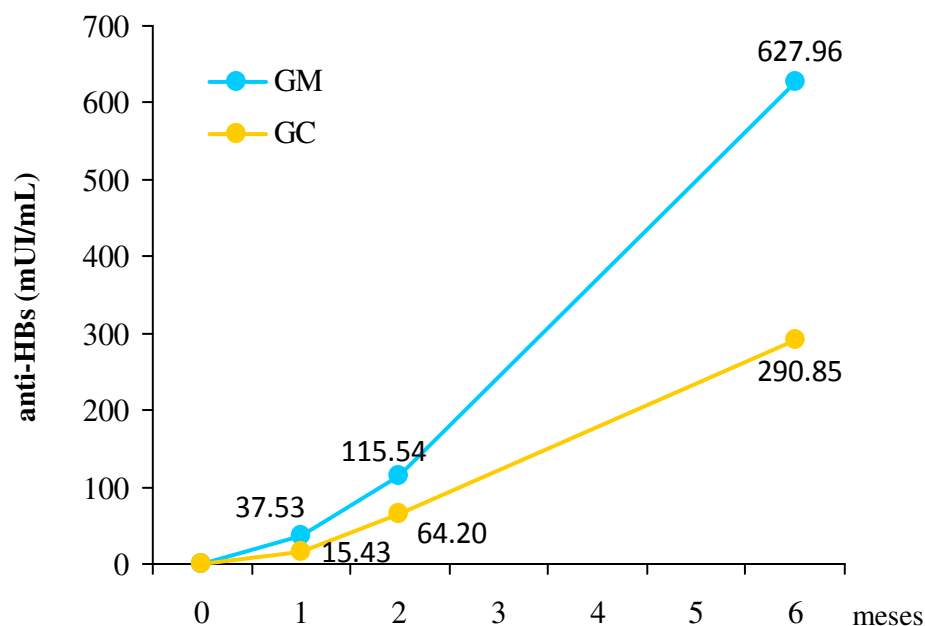
**Tabla 1.** Distribución de la población de estudio

	GM		GC	
	Mujeres	Varones	Mujeres	Varones
<b>n</b>	12	23	12	23
<b>Edad (X)</b>	23.54	22.91	23.64	22.57
<b>Edad<sub>máx</sub></b>	49	35	52	32
<b>Edad<sub>mín</sub></b>	19	19	18	18

## II. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

### 1. Dosaje de anticuerpos anti-HBs

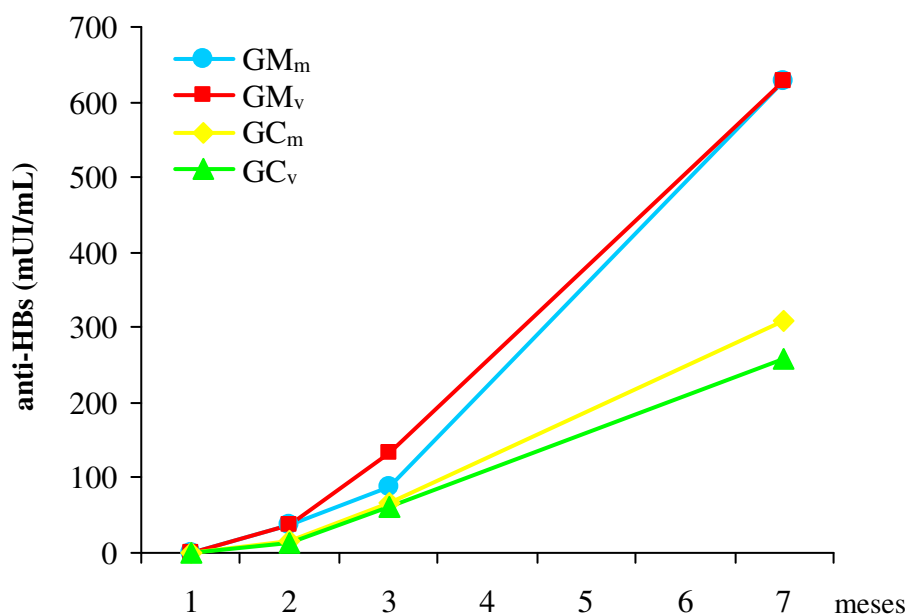
Los títulos de anticuerpos anti-HBs fueron determinados por el método de ELISA, para ello se emplearon todas las muestras de suero obtenidas a 1, 2 y 6 meses. Los resultados después de 1 mes de iniciado el estudio mostraron que los mayores títulos de anticuerpos se produjeron en los voluntarios del GM ( $p < 0.0001$ ). De los resultados obtenidos a 2 meses de iniciado el estudio se debe resaltar que el título de anticuerpos en el GM continuó siendo significativamente mayor ( $p < 0.0001$ ). Finalmente a los 6 meses de aplicada la primera dosis de la vacuna se realizó el último dosaje del título de anticuerpos en el GM, aunque este grupo dejó de recibir maca durante 4 meses, ya que el protocolo del estudio fue establecido para 2 meses, los títulos de anticuerpos continuaron siendo mayores ( $p < 0.0001$ ) (Figura 5). También se realizó la evaluación del título de anticuerpos según el sexo, los resultados muestran que las voluntarias del GM produjeron mayores títulos de anticuerpos a 1, 2 y 6 meses con respecto al GC ( $p < 0.0001$ ). En los resultados obtenidos de los voluntarios del GM se encontró que también mostraron los mayores títulos de anticuerpos a 1, 2 y 6 meses ( $p < 0.0001$ ) (Tabla 2, Figura 6).



**Figura 5.** Efecto del tratamiento con maca sobre la respuesta inmune humoral, producción de anticuerpos en los grupos de tratamiento GM y GC

**Tabla 2.** Producción de anticuerpos según el sexo en los grupos de tratamiento GM y GC

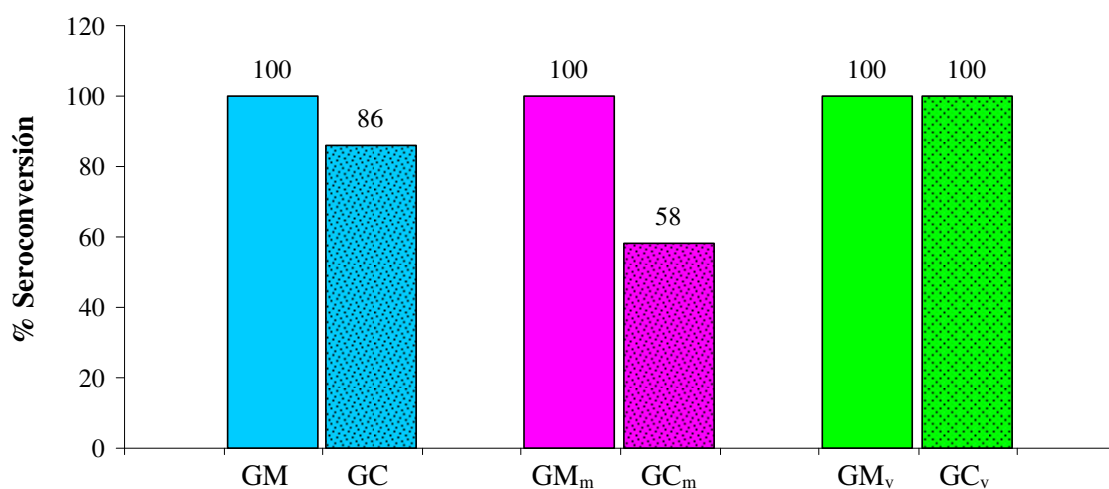
Meses	anti-HBs(mUI/mL)			
	Mujeres		Varones	
	GM <sub>m</sub>	GC <sub>m</sub>	GM <sub>v</sub>	GC <sub>v</sub>
1	37.09	12.24	37.79	17.31
2	87.51	61.25	132.10	65.94
6	628.93	259.44	627.40	309.40



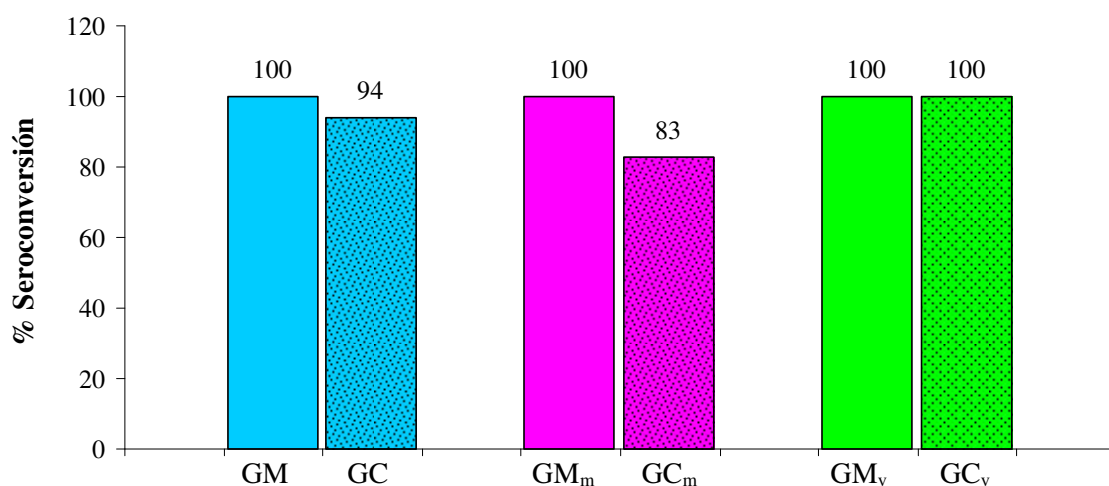
**Figura 6.** Efecto del tratamiento con maca sobre la respuesta inmune humoral, comparación de la producción de anticuerpos en mujeres y varones del GM y GC

## 2. Seroconversión

El uso de la vacuna contra la hepatitis B ha aumentado la utilidad de determinar anti-HBs, ya sea en la pre-inmunización en la monitorización de la seroconversión después de una inmunización. La seroconversión está dada por una concentración sérica de anti-HBs superior a 1 mUI/mL en el suero de pacientes a 1 mes de recibir la primera dosis de la vacuna. Los resultados mostraron que todos los participantes del GM seroconvirtieron, al comparar este porcentaje con el GC no se encontraron diferencias significativas ( $p=0.054$ ) y a los dos meses se encontró que todos los participantes de ambos GM y GC habían seroconvertido. En cuanto al porcentaje de seroconversión según el sexo nuestros resultados indican que las voluntarias del GM tuvieron un mayor porcentaje de seroconversión a 1 mes de iniciado el tratamiento ( $p=0.037$ ) y a los dos meses las todas las voluntarias de ambos grupos seroconvirtieron. En cuanto a los porcentajes de seroconversión en los voluntarios, los resultados indican que ambos grupos, a 1 y 2 meses de iniciado el estudio fueron los mismo, todos seroconvirtieron (Figura 7 y 8).



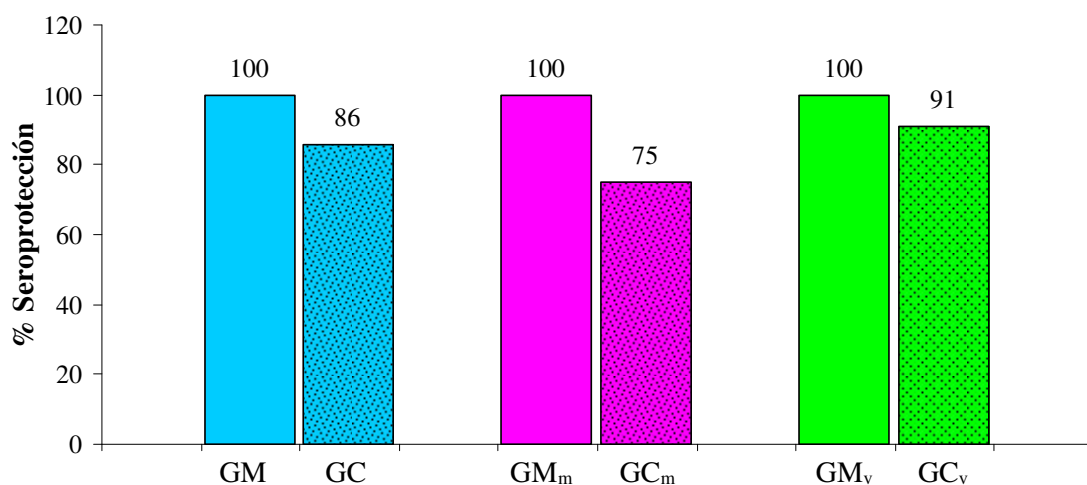
**Figura 7.** Comparación de la seroconversión entre los grupos de tratamiento, en mujeres (m) y varones (v) del GM y GC después de 1 mes de la primera dosis con la vacuna Gene Vac B.



**Figura 8.** Comparación de la seroconversión entre los grupos de tratamiento, en mujeres y varones del GM y GC después de 2 mes de la primera dosis con la vacuna Gene Vac B.

### 3. Seroprotección

La seroprotección está dada por una concentración sérica de anti-HBs superior a 10 mUI/mL en el suero de pacientes después de recibir la primera dosis de la vacuna. Los resultados muestran que el GM obtuvo el mayor porcentaje de seroprotección a 1 mes ( $p=0.034$ ) y 2 meses ( $p=0.025$ ) de iniciado el estudio. Los resultados obtenidos en el análisis según el sexo indicaron que el mayor porcentaje de seroprotección se encontró en las voluntarias del GM a 1 mes ( $p=0.037$ ) y a los 2 meses ambos grupos obtuvieron los mismos porcentajes de seroprotección (100%). En cuanto a los voluntarios a la igual que las voluntarias los mayores porcentajes de seroconversión se encontraron en el GM a 1 mes ( $p=0.035$ ) y a los 2 meses ( $p=0.022$ ) de iniciado el estudio (Figura 9).

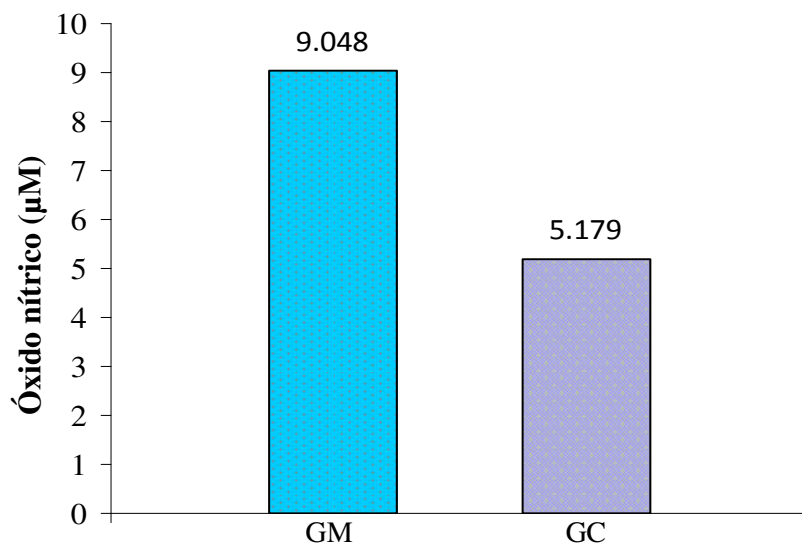


**Figura 9.** Comparación de la seroprotección entre los grupos de tratamiento, en mujeres (m) y varones (v) del GM y GC, después de 2 mes de la primera dosis con la vacuna Gene Vac B.

### III. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

#### 1. Activación de células mononucleares de sangre periférica

El estudio de la activación de las CMSP para la producción de óxido nítrico cuantificado mediante el dosaje de nitrito en el sobrenadante de los cultivos respectivos, se realizó a 2 meses de iniciado el estudio. Las concentraciones producidas de nitrito en los GM y GC fueron de 9.05  $\mu\text{M}$  y 5.11  $\mu\text{M}$  respectivamente, nuestros resultados muestran que el tratamiento con maca indujo una mayor producción de óxido nítrico en los cultivos realizados ( $p < 0.0001$ ) (Figura 10).



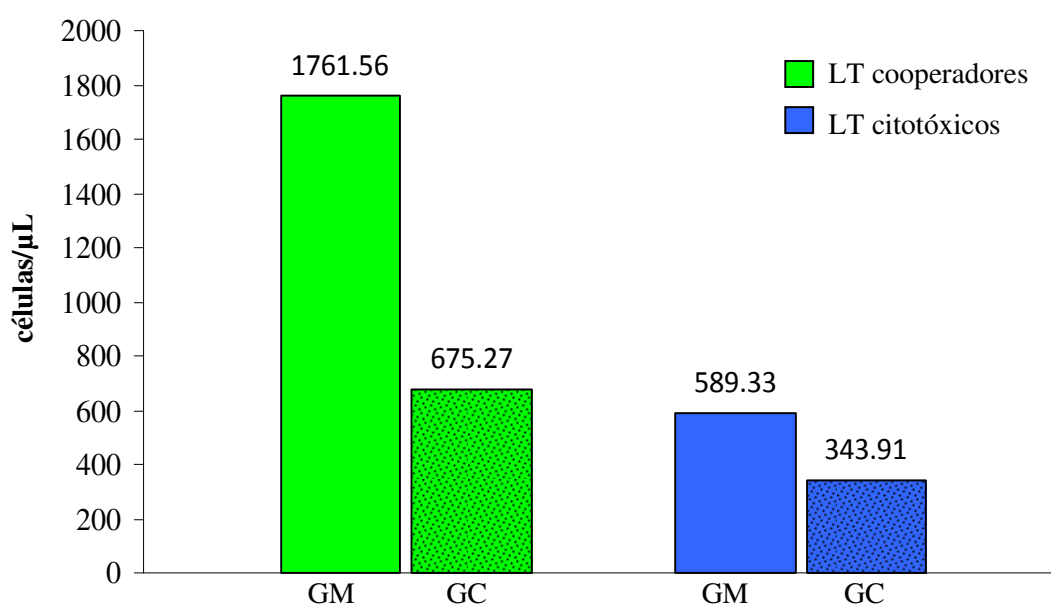
**Figura 10.** Comparación de la producción de ON de los cultivos de CMSP obtenidos de los grupos de tratamiento GM y GC, después de 2 mes de iniciado el tratamiento experimental.

## 2. Cuantificación de la población de linfocitos CD3+CD4+ y CD3+CD8+

El curso natural de infección del VHB está determinado por la interacción entre la replicación del virus y la respuesta inmune y los adultos infectados por el VHB son capaces de eliminarlo mediante la estimulación eficaz del sistema inmune con la activación de los linfocitos T citotóxicos ayudados por la acción antiviral de las citoquinas producidas por los linfocitos T cooperadores.

Los valores normales para el recuento de linfocitos T cooperadores (LT CD3+CD4+) oscilan entre 410 a 1590 células/ $\mu$ L y los linfocitos T citotóxicos (LT CD3+CD8+) oscilan entre 190 a 1140 células/ $\mu$ L; estos valores son referenciales para el análisis de los resultados.

La cuantificación de la población de linfocitos T cooperadores se realizó a los 2 meses de iniciado el tratamiento que coincidió con la primera dosis con la vacuna Gene Vac B. Los resultados obtenidos muestran que el mayor recuento de linfocitos T cooperadores se presentó en el GM ( $p < 0.0001$ ), 1761.56 células/ $\mu$ L del GM en comparación con 675.27 células/ $\mu$ L del GC. Al igual que los linfocitos T cooperadores la cuantificación de los linfocitos T citotóxicos se realizó a 2 meses de iniciado el tratamiento que coincidió con la primera dosis con la vacuna Gene Vac B. Los resultados indican que el GM mostró el mayor recuento de linfocitos T citotóxicos ( $p < 0.0001$ ), 589.33 células/ $\mu$ L del GM en comparación con 343.91 células/ $\mu$ L del GC (Figura 11).



**Figura 10.-** Comparación de población de linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos entre los grupos de tratamiento GM y GC, después de 2 mes de iniciado el tratamiento experimental.

### 3. Cuantificación de leucocitos

La cuantificación de leucocitos se realizó a partir de los hemogramas practicados a todos los voluntarios de ambos grupos de tratamiento a 1 y 2 meses de iniciado el estudio.

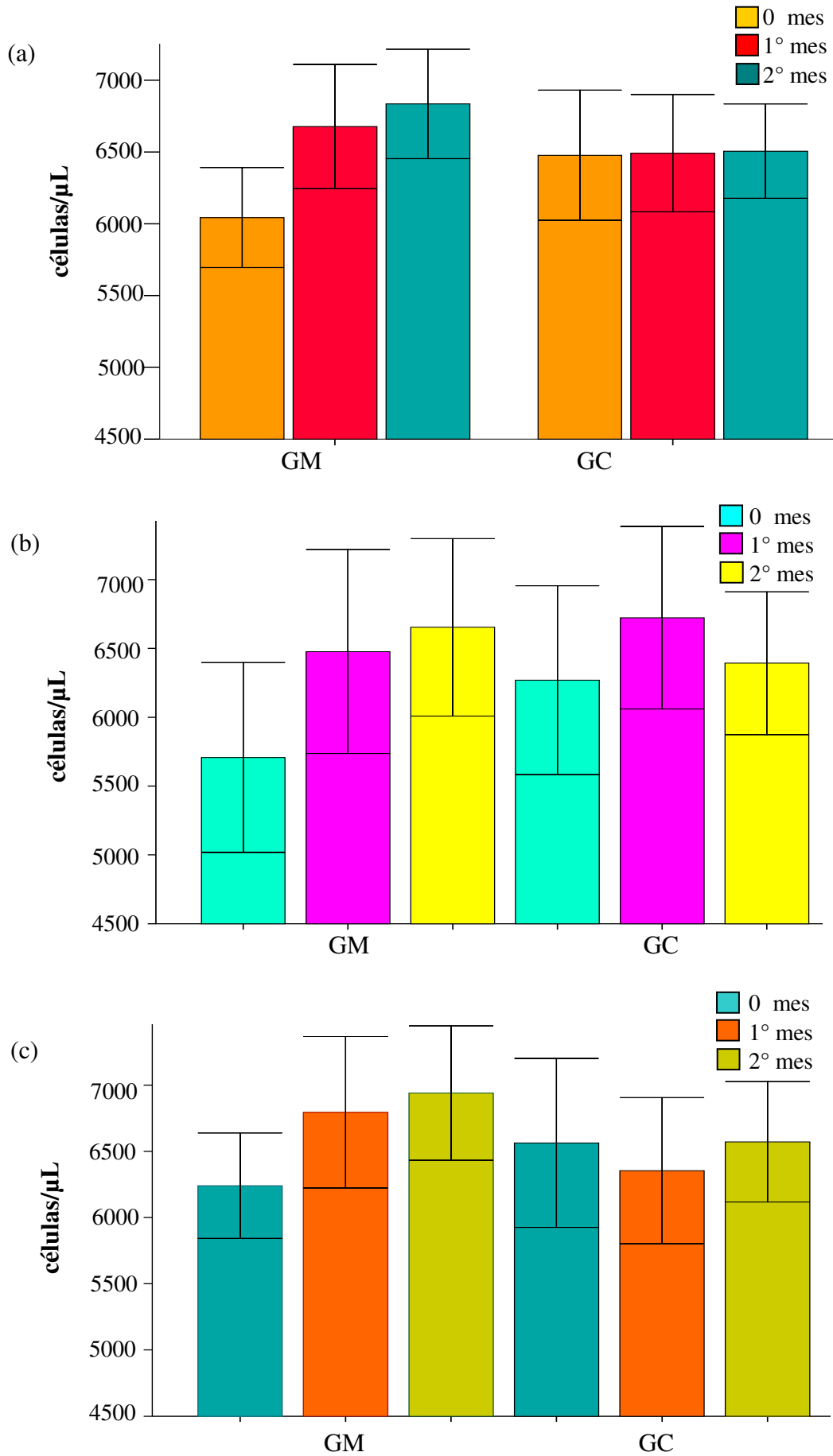
#### a. Leucocitos totales

Nuestros resultados indican que al inicio del estudio el mayor recuento de leucocitos se presentó en el GC que fue significativamente superior al GM ( $p=0.033$ ), a 1 mes aunque el recuento en el GM fue ligeramente superior al GC, la diferencia no fue significativa ( $p=0.651$ ) y finalmente a los 2 meses aunque el recuento en el GM fue ligeramente superior tampoco se halló diferencia significativa ( $p=0.435$ ). Se debe indicar también que el GM experimentó un incremento significativo del recuento de leucocitos a 1 mes ( $p=0.002$ ) y 2 meses ( $p=0.039$ ) de iniciado el estudio. No se registró ninguna variación significativa del recuento de leucocitos en el GC con respecto al recuento inicial (Tabla 3, Figura 12a). Se realizó la evaluación del recuento de leucocitos según el sexo, los resultados obtenidos muestran que los recuentos de leucocitos en las voluntarias del GM experimentaron un incremento significativo con respecto al recuento inicial a 1 ( $p=0.009$ ) y 2 meses ( $p=0.029$ ) de iniciado el estudio (Figura 12b). En los voluntarios solamente se encontró un ligero incremento a 1 mes pero este no fue significativo en comparación con el recuento inicial ( $p=0.068$ ) (Figura 12c).

**Tabla 3.** Efecto del tratamiento con maca sobre el recuento de leucocitos entre los grupos de tratamiento, en mujeres (m) y varones del GM y GC; después de 1 y 2 mes de iniciado el estudio tratamiento experimental con respecto al recuento inicial.

	Meses	GM	GC	Mujeres		Varones	
				GM <sub>m</sub>	GC <sub>m</sub>	GM <sub>v</sub>	GC <sub>v</sub>
Leucocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0	6.02	6.53	5.54	6.50	6.29	6.54
	1	6.68	6.61	6.64	6.73	6.70	6.56
	2	6.59	6.47	6.59	6.48	6.46	6.47





**Figura 12.** Comparación del recuento de leucocitos: (a) entre los grupos de tratamiento GM y GC, (b) en mujeres del GM y GC y (c) en varones del GM y GC; después de 1 y 2 mes de iniciado el estudio tratamiento experimental con respecto al recuento inicial.

## **b. Neutrófilos**

Los resultados muestran una reducción significativa del recuento de neutrófilos al mes de iniciado el estudio en el GM ( $p=0.039$ ) y GC ( $p=0.042$ ) en comparación con los recuentos iniciales, a los 2 meses se incrementaron ambos pero al ser comparados con el inicial este incremento no fue significativo. En el análisis según el sexo, no se obtuvo diferencias ni se registró incremento o reducción significativa de recuento de neutrófilos en las voluntarias y voluntarios del GM en comparación con GC y con los recuentos iniciales al inicio (Tabla 4).

## **c. Linfocitos**

Con respecto al recuento de linfocitos se registró una reducción significativa ( $p=0.017$ ) a los 2 meses en el GC en comparación con el recuento obtenido al inicio del estudio, en el GM no se presentaron variaciones significativas a 1 y 2 meses. Según el análisis por sexos, se encontró diferencias significativas del recuento de linfocitos en las voluntarias ( $p=0.007$ ) del GM en comparación con GC además se registró un incremento del recuento de linfocitos a los 2 meses pero al compararlo con el recuento inicial no fue significativo ( $p=0.132$ ). No hubo diferencias significativas en los recuentos de linfocitos en los voluntarios del GM al inicio, al mes y a los 2 meses en comparación con el GC y con el recuento inicial (Tabla 4).

## **d. Monocitos, Eosinófilos y Basófilos**

Al realizar el hemograma a las muestras de sangre, los monocitos, eosinófilos y basófilos se encuentran juntos en un grupo denominado células mixtas. Los resultados muestran que el GM experimentó un incremento significativo del recuento de las células mixtas solamente a los 2 meses ( $p<0.0001$ ). No se registró ningún incremento significativo del recuento de las células mixtas en el GC con respecto al recuento inicial. Al analizar los resultados según el sexo, se registró un incremento significativo del recuento de las células mixtas a los 2 meses ( $p<0.0001$ ) en las voluntarias del GM. No hubo diferencias significativas en los recuentos de las células mixtas en los voluntarios del GM al inicio, al mes y a los 2 meses en comparación con el recuento inicial (Tabla 4).

**Tabla 4.** Efecto del tratamiento con maca sobre el recuento de neutrófilos, linfocitos y mixtos entre los grupos de tratamiento, en mujeres y varones del GM y GC; después de 1 y 2 mes de iniciado el tratamiento experimental con respecto al recuento inicial.

	Meses	GM	GC	Mujeres		Varones	
				GM <sub>m</sub>	GC <sub>m</sub>	GM <sub>v</sub>	GC <sub>v</sub>
<b>Neutrófilos</b> (10 <sup>3</sup> /μL)	<b>0</b>	3.55	3.13	2.47	3.10	2.60	3.04
	<b>1</b>	2.93	2.77	2.89	2.81	2.96	2.75
	<b>2</b>	3.67	3.30	2.64	3.29	2.69	3.30
<b>Linfocitos</b> (10 <sup>3</sup> /μL)	<b>0</b>	2.11	1.86	1.91	1.80	2.22	1.90
	<b>1</b>	2.32	2.09	2.47	2.32	2.25	2.07
	<b>2</b>	2.58	1.49	2.52	1.41	1.96	1.53
<b>Mixtos</b> (10 <sup>3</sup> /μL)	<b>0</b>	1.04	1.35	0.88	1.41	1.13	1.38
	<b>1</b>	1.11	1.45	1.11	1.52	1.10	1.42
	<b>2</b>	1.64	1.42	1.64	1.56	1.14	1.35

### III. CUANTIFICACIÓN DE ERITROCITOS Y HEMOGLOBINA

La cuantificación de eritrocitos y hemoglobina se obtuvo de los hemogramas realizados al inicio de estudio y después de 1 y 2 meses contados a partir de la primera dosis con la vacuna Gene Vac B.

#### 1. Eritrocitos

Nuestros resultados indican que al inicio del estudio y al mes no se registraron diferencias significativas en el recuento de eritrocitos en el GM con respecto al GC, a los 2 meses los recuento de eritrocitos entre los GM y GC no fueron estadísticamente significativos ( $p=0.137$ ) aunque el GM mostró mayor recuento. Al mes y a los 2 meses no se registró un incremento o reducción significativa de los recuento de eritrocitos del GM en comparación con el GC y con los recuentos iniciales. Al realizar el análisis según el sexo no se obtuvieron diferencias ni se registró incremento o reducción significativa en el recuento de eritrocitos en las voluntarias y voluntarios del GM en comparación con GC y con los recuentos iniciales (Tabla 5).

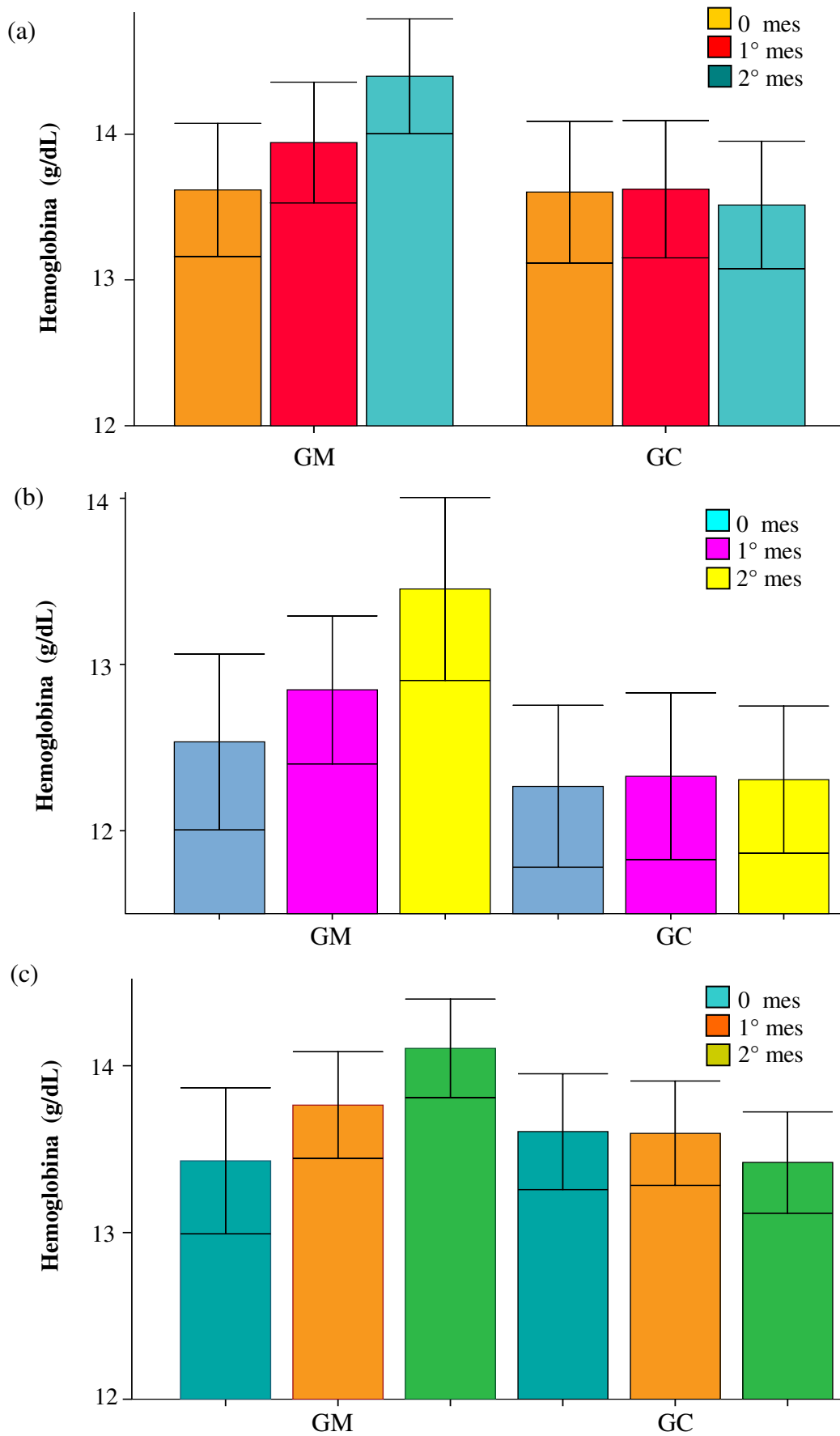
## 2. Hemoglobina

Los resultados obtenidos muestran que el GM solamente experimentó un incremento significativo de la concentración de la hemoglobina a los 2 meses ( $p < 0.0009$ ) de iniciado el estudio con respecto a la concentración inicial. No se registró un incremento significativo de la concentración de hemoglobina en el GC con respecto a la concentración inicial al mes y a los 2 meses (Tabla 5, Figura 13a). Cuando se realizó el análisis de los resultados según el sexo, se encontró que al inicio no hubieron diferencias significativas en la concentración de hemoglobina en las voluntarias del GM en comparación con GC, al mes y a los 2 meses se registraron diferencias significativas ( $p = 0.012$  y  $p = 0.027$  respectivamente); la concentración de la hemoglobina en las voluntarias se incremento significativamente al mes y a los 2 meses con respecto al inicial ( $p = 0.016$  y  $p = 0.017$  respectivamente) (Figura 13b). Al mes y a los 2 meses no se registró un incremento o reducción significativa de la concentración de hemoglobina en los voluntarios de ambos grupos de tratamiento (Figura 13c).

Además se realizó el análisis del recuento de las plaquetas de los hemogramas realizados. No se registraron diferencias significativas del recuento de plaquetas del GM con respecto al GC al inicio, al mes y a los 2 meses. Al mes y a los 2 meses no se registró un incremento o reducción significativa de los recuento de plaquetas del GM en comparación con el GC y con los recuentos iniciales. No se obtuvieron diferencias ni se registró incremento o reducción significativa de los recuento de plaquetas en las voluntarias y voluntarios del GM en comparación con GC y con los recuentos iniciales

**Tabla 5.** Efecto del tratamiento con maca sobre el recuento de eritrocitos y la hemoglobina entre los grupos de tratamiento, en mujeres y varones del GM y GC; después de 1 y 2 mes de iniciado el tratamiento experimental con respecto al recuento inicial.

	Meses	GM	GC	Mujeres		Varones	
				GM <sub>m</sub>	GC <sub>m</sub>	GM <sub>v</sub>	GC <sub>v</sub>
<b>Eritrocitos</b> (10 <sup>3</sup> /μL)	<b>0</b>	14.69	14.29	13.89	13.72	14.85	14.62
	<b>1</b>	14.60	14.35	14.34	13.71	14.75	14.72
	<b>2</b>	14.76	14.10	14.46	14.00	14.92	14.65
<b>Hemoglobina</b> (g/dL)	<b>0</b>	13.64	13.53	12.19	12.19	14.42	14.29
	<b>1</b>	14.04	13.74	13.05	12.32	14.59	14.54
	<b>2</b>	14.44	13.83	13.80	12.24	14.96	14.22



**Figura 13.** Comparación de la concentración de la hemoglobina: (a) entre los grupos de tratamiento GM y GC, (b) en mujeres del GM y GC y (c) en varones del GM y GC; después de 1 y 2 mes de iniciado el estudio tratamiento experimental con respecto al recuento inicial.

## DISCUSIÓN

La hepatitis B es la más importante enfermedad prevenible por inmunización, inicialmente recomendada únicamente para zonas de alta prevalencia, ha sido propuesta actualmente para todos los países, porque se ha demostrado que sólo mediante la vacunación se podrá controlar la propagación de este virus. Actualmente, las vacunas disponibles contra la hepatitis B están compuestas de preparaciones de HBsAg altamente purificadas producidas a partir de plásmidos que contienen el gen que codifica el HBsAg, dentro de células de levaduras (Lee *et al.*, 1997). En el presente estudio se usó la vacuna comercial Gene Vac, que contiene 20 µg/mL de HBsAg recombinante adsorbido en hidróxido de aluminio que fue aplicada a 70 personas adultas sanas con edades entre 18 a 52 años distribuidas al azar en dos grupos para evaluar si el consumo de maca en uno de los grupos incrementa la respuesta inmune frente a la vacuna.

La capacidad protectora de la vacunación contra la hepatitis B está directamente relacionada con el desarrollo de anticuerpos anti-HBs. Las personas quienes desarrollan títulos de anti-HBs  $\geq 10$  mUI/mL, están virtualmente protegidos contra la enfermedad aguda y la infección crónica.

A pesar que las vacunas disponibles comercialmente contra la hepatitis B han demostrado excelente inmunogenicidad y alta eficacia protectora, se ha descrito que aproximadamente entre 4 a 10% de los adultos sanos inmunocompetentes no producen niveles protectores de anti-HBs. Este grupo de individuos incluye no respondedores y bajos respondedores, quienes son incapaces de producir niveles de anti-HBs detectables ( $\geq 1$  mUI/mL) o protectores ( $\geq 10$  mUI/mL) (Desembere *et al.*, 2000).

La búsqueda de compuestos naturales con propiedades inmunopotenciadoras constituye una nueva estrategia para mejorar la inmunogenicidad de antígenos recombinantes por lo que han expandido dramáticamente las posibilidades de desarrollar nuevas vacunas y mejorar las desarrolladas en la última década (Mora *et al.*, 2006).

Diversos estudios respaldan el hecho de que las vacunas recombinantes requieren compuestos con actividad inmunopotenciadora que mejoren y estimulen una adecuada respuesta inmune, en muchos casos un grupo químico es el que interactúa de manera

específica con los receptores Toll-like (respuesta inmune innata); activa una serie de señales intracelulares que estimula al factor nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) en la célula presentadora de antígeno, esto promueve la expresión de genes que están encargados de la síntesis de citoquinas y de la producción de ligandos coestimuladores B7-1(CD80) y B7-2 (CD86), todo esto señala la importancia del estudio de nuevos adyuvantes (Dante *et al.*, 2003).

Después de la primera dosis con la vacuna, el HBsAg inoculado es procesado por las células presentadoras de antígenos para luego ser presentados a los linfocitos T CD4+. Las citoquinas producidas por los linfocitos T CD4+ induce la diferenciación de los linfocitos B que inician en la producción de anti-HBs protectores (Chisari *et al.*, 1995). También los linfocitos T CD8+ son esenciales para eliminar el virus de los hepatocitos infectados produciendo la destrucción de células infectadas; los anticuerpos producidos después de la vacunación neutralizarán al virus en la sangre y en los espacios extracelulares bloqueando la progresión de la infección por inhibición de la viremia inicial y secundaria que ocurre en la infección con el VHB (Dante *et al.*, 2003).

Todos los voluntarios que recibieron maca registraron una significativa producción de anticuerpos anti-HBs a 1, 2 y 6 meses contados a partir de la primera dosis con la vacuna Gene Vac B (Tabla 1, Figura 5). Al contener la maca compuestos biológicamente activos como: glucosinolatos, isotiocianatos, alcaloides, saponinas, flavonoides, triterpenos y sesquiterpenos, se le podría atribuir a algunos de ellos un probable efecto inmunopotenciador sobre la respuesta inmune humoral; el uso de la vacuna contra el VHB tiene como fin la producción de anti-HBs y es necesario que la producción de éstos anticuerpos se de en una suficiente concentración para que el individuo vacunado se encuentre protegido contra el VHB; además de esto, la utilidad de determinar anti-HBs radica en el tamizaje en la pre-inmunización o en la monitorización de la seroconversión después de la inmunización, por ello la producción de anticuerpos específicos anti-HBs es el principal marcador indicativo de inmunidad frente a la vacunación contra el VHB.

La seroconversión y seroprotección son dos indicadores obtenidos a partir de la respuesta humoral contra el VHB, el primero indica la existencia de una producción inicial de anti-HBs y el segundo si esta producción de anticuerpos se da en una suficiente concentración que pueda otorgar al individuo vacunado la protección eficaz contra la infección con el VHB.

En el presente estudio, después de un mes de haber recibido la primera dosis de la vacuna, se encontró que los voluntarios tratados con maca seroconvirtieron en un mayor porcentaje en comparación con el GC (Figura 7), pero esta diferencia no fue significativa; a los 2 meses (Figura 8) se encontró un mayor porcentaje de seroconversión y de seroprotección en los voluntarios que recibieron maca en comparación con los del GC, esta diferencia si fue significativa (Figura 9).

En cuanto al porcentaje de seroconversión en las voluntarias al mes fue significativamente mayor que del GC, a los 2 meses los porcentajes de seroprotección en las voluntarias y voluntarios que recibieron maca fueron también significativamente superiores; en los voluntarios que recibieron maca los porcentajes de seroconversión y seroprotección fueron mayores al primer y segundo mes de iniciado el estudio. Esto indicaría que el consumo de maca estimula una mayor producción de anti-HBs en los voluntarios que la consumieron, también incrementó significativamente la producción de anticuerpos en los voluntarios en comparación con las voluntarias mejorando los porcentajes de seroconversión y seroprotección después de la segunda dosis de la vacuna en todos los voluntarios tratados con maca.

Dupont *et al.*, (2004) reportaron la seroprotección en un estudio similar después de la segunda dosis de vacuna experimental AgB/RC-210-04, que consistió en AgB<sup>®</sup> más el compuesto basado en un monosacárido (aminoalquil glucosamida-4-fosfato) compuesto análogo al disacárido hexaacilado del monofosforil Lípido A (MPL<sup>®</sup>), los resultados del estudio de Dupont *et al.*, (2004) indicaron al igual que el presente estudio que la adición del compuesto a la vacuna estándar (AgB<sup>®</sup>) contra la VHB acelera y produce una respuesta inmune más fuerte que la vacuna estándar, la de tasa seroprotección en el grupo experimental fue mayor que la obtenida en el grupo AgB<sup>®</sup> en los meses 1, 2, 3 y 6; lo interesante es que al igual que el presente estudio los porcentajes de seroprotección en el grupo experimental fueron más altos al segundo mes, esta mayor respuesta inmune alcanzada después de la segunda dosis sugiere al igual que Dupont *et al.*, (2004), que el esquema de vacunación de tres dosis en 6 meses podría ser reducido a sólo dos dosis, reduciendo así el tiempo necesario para lograr producir títulos de anticuerpos seroprotectores manifestando claramente que la vacuna con un compuesto inmunopotenciador induce una rápida y mucho mas fuerte respuesta inmune.



Sharma *et al.*, (1994), analizaron el efecto del compuesto RLJ-NE 299A aislado de las raíces de *Picrorhiza kurroa* sobre la actividad fagocítica de los macrófagos y de leucocitos polimorfonucleares, en sus resultados reportaron que este compuesto incrementó la actividad fagocítica y también estimuló la actividad de los linfocitos T citotóxicos, se encontró que el compuesto inyectado vía intraperitoneal incrementó notablemente la producción de anticuerpos, de citoquinas como IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  y además produjo cantidades significativas de IL-10 por células CD4+.

Los macrófagos juegan un papel crucial en la modulación de la inmunidad humoral y celular; sus funciones dependen de su activación ya sea por señales de sensibilización, producidas principalmente por citocinas (IFN- $\gamma$ ) o por señales de activación. Los macrófagos responden al ataque de bacterias, virus y parásitos activándose mediante diversos receptores, tales como los receptores tipo Toll. Los macrófagos activados producen mediadores de citotoxicidad, tales como el óxido nítrico y TNF- $\alpha$ , los cuales protegen al organismo en contra del desarrollo de infecciones y tumores (Reyes *et al.*, 2001). Respecto a la producción de NO en cultivos de células mononucleares de sangre periférica de los voluntarios que recibieron maca se observó una mayor producción de NO (9.05  $\mu$ M del GM en comparación con 5.11  $\mu$ M del GC) (Figura 10). Esto indica que probablemente el tratamiento con maca induzca al activación de macrófagos; en concordancia con otros estudios de extractos obtenidos de plantas sobre la producción de NO. Se ha encontrado que polisacáridos de plantas superiores activan a los macrófagos (Schepetkin y Quinn, 2006), estos polisacáridos han mostrado incrementar actividad citotóxica del macrófago contra microorganismos y células tumorales, en macrófagos activados se encontró que incrementaron la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan la peroxidación de las cadenas de ácidos grasos insaturados lo cual altera su funcionamiento e inactiva proteínas; y de NO que inhibe la producción de trifosfato de adenosina y la síntesis ADN. Además, incrementa la secreción de citoquinas así como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleuquinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- $\gamma$  e IFN- $\beta$ 2. Como un ejemplo, el arabinogalactano contenido en extracto de polisacáridos de *Juniperus scopolorum* posee una potente propiedad inmunopotenciadora en macrófagos humanos y murinos al inducir la producción de iNOS y NO, e incrementar la producción principalmente de ROS; y de citoquinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ ) y de citoquinas antiinflamatorias (IL-10) (Schepetkin *et al.*, 2005).

Muchos estudios han enfatizado en el rol crítico de la respuesta inmune celular en la resolución de la enfermedad causada por VHB. Los linfocitos T CD3+CD4+ (linfocitos cooperadores) activados durante la infección con el VHB pueden diferenciarse en linfocitos T helper 1 (LT<sub>H1</sub>) o en linfocitos T helper 2 (LT<sub>H2</sub>) pudiendo cada uno secretar un conjunto específicos de citoquinas. La respuesta de los T<sub>H1</sub> está asociada con una fuerte respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos mientras que la respuesta de los T<sub>H2</sub> esta caracterizada por una respuesta humoral o mediada por anticuerpos. Pacientes con cuadros agudos de infección pudieron superar este estado desarrollando una vigorosa y multiespecífica respuesta de linfocitos T CD3+CD4+ y CD3+CD8+ (LT citotóxicos) para eliminar VHB de su organismo. Se ha observado por el contrario que pacientes con infección crónica muestran una muy limitada o imperceptible respuesta inmune celular (Roy *et al.*, 2001). En el presente estudio los mayores recuentos de linfocitos T cooperadores y citotóxicos se presentaron en los voluntarios que recibieron maca en comparación con el GC (Figura 11). Un incremento marcado del recuento de LT<sub>H</sub> afecta la producción total de anti-HBs y mejora eficazmente la producción de anticuerpos contra el VHB; así, este estudio muestra que la adición de maca indujo un incremento equilibrado de la respuesta de LT<sub>H1</sub> y LT<sub>H2</sub> contra el HBsAg.

El incremento de la actividad fagocítica de los macrófagos también tiene relación con el incremento de células de la médula ósea y sangre periférica, ya que los macrófagos producen factores o secretan mediadores como el factor estimulador de colonias, interleuquinas, que influye en la proliferación de leucocitos. En nuestro estudio los voluntarios que recibieron maca registraron un incremento en el recuento de leucocitos totales (Figura 11, Tabla 3); al realizar el recuento diferencial, donde se diferenció los neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos, no se registraron variaciones significativas en el recuento de neutrófilos en ambos grupos de tratamiento, pero si se observó un ligero incremento de linfocitos probablemente debido al proceso de inmunización con la vacuna, producción de anticuerpos, esto solamente se observó en las voluntarias del GM después de 2 meses de tratamiento con maca y finalmente el recuento de células mixtas (monocitos, eosinófilos y basófilos) fue significativamente superior los voluntarios que recibieron maca, esto probablemente debido al incremento de la actividad fagocítica de células mononucleares (monocitos y macrófagos) necesaria para la presentación los antígenos contenidos en la vacuna a los linfocitos T (Tabla 4).

Pérez *et al.*, (2004) evaluaron los efectos de los extractos hidroalcohólicos de *Phenax rugosus*, *Tabebuia chrysantha*, *Althernantera williamsii* y *Solanum dolichosepalum* sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas. Los investigadores demostraron que *P. rugosus* y *S. dolichosepalum* producían una elevación del recuento total y diferencial de leucocitos sin modificación alguna en la producción de anticuerpos hemaglutinantes anti – GRC. Existen reportes de extractos obtenidos de plantas que incrementan las poblaciones de células mononucleares; por ejemplo, Song *et al.*, 2002 reportan que el tratamiento *in vivo* con el polisacárido aislado de *Chelidonium majus* incrementa el número de granulocitos y de macrófagos. La administración subcutánea de CARN 750, un manano aislado de *Aloe barbadensis*, también exhibe una significativa actividad hematopoyética e induce un incremento en el número absoluto de monocitos (Egger *et al.*, 1996).

El alto valor nutritivo de la maca no solo radica en su contenido de proteínas y carbohidratos, sino también en el contenido de algunos minerales como Fe, Ca, Cu y Zn (Dini *et al.*, 1994); es precisamente su alto contenido de hierro en comparación con otras raíces y/o tubérculos andinos lo que motiva el interés del consumo como complemento alimenticio en el tratamiento de enfermedades producidas por la deficiencia de este mineral.

El hierro, un elemento importante tanto para la planta misma como para los que la consumen, es absorbido del suelo por las raíces y transportado a otros órganos de la planta donde se usa de inmediato o puede acumularse. El hierro forma parte de muchas enzimas que participan en la fotosíntesis y otras rutas metabólicas (Tillán *et al.*, 2004).

La anemia ferropénica es una de las enfermedades causadas fundamentalmente por una deficiencia nutricional de hierro, defectuosa absorción, aumento de las necesidades y/o pérdidas excesivas de este metal; pudiendo existir una suma de varios de estos factores para generar esta patología; esta deficiencia suele presentarse también en el embarazo, e incluso en los países desarrollados se reporta una gran incidencia de anemia en la población (Tillán *et al.*, 2004). En el presente estudio se determinó el incremento significativo de la concentración de la hemoglobina en las voluntarias que recibieron maca en comparación con el GC, se registró un incremento de la hemoglobina en los voluntarios del GM pero al ser comparado con el GC no fue significativo. Los participantes de ambos grupos al final del tratamiento, lograron alcanzar valores normales de eritrocitos sin

presentar diferencias significativas entre ellos (Figura 13, Tabla 5). Es conocido que el hierro es indispensable para la formación de hemoglobina, pero no es el responsable fundamental de la formación de los eritrocitos, por lo que este último proceso puede no afectarse.

## CONCLUSIONES

- Después de tratamiento con la especie *Lepidium peruvianum* Chacón, se demostró que sí presenta actividad inmunopotenciadora sobre la respuesta inmune humoral y celular a la vacuna contra la hepatitis B.
- El tratamiento con maca indujo en los individuos vacunados un mayor porcentaje de seroconversión y seroprotección.
- La activación de las células mononucleares de sangre periférica resultó inmunopotenciada por el tratamiento con maca.
- El tratamiento con maca actuó como estimulante de la actividad hematopoyética, los hemogramas realizados evidenciaron el incremento de los leucocitos totales, linfocitos y células mixtas; además el análisis por citometría de flujo confirmó el incremento de las poblaciones de linfocitos T cooperadores y citotóxicos.
- La administración oral de maca pulverizada a la dosis de 3g/día produjo el incremento de la hemoglobina especialmente en mujeres.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aliaga, R. 2000. Raíces Andinas contribución al conocimiento y a la capacitación. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.
- Alvarez, E. 2008. Estudio comparativo de la actividad moduladora del extracto metanólico de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón (maca) sobre la respuesta inmune humoral y celular en ratones. Tesis para optar el Título Profesional. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Alzamora, L. 2003. Estudio del efecto antitumoral e inmunomodulador del extracto clorofórmico de raíces de *Lepidium peruvianum* G. Chacón “Maca” (Brassicaceae) en ratones. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Alzamora, L., Álvarez, E., Torres, D., Solís, H., Colona, E., Quispe, J., Chanco, M. 2007a. Efecto de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón sobre la producción de óxido nítrico *in vitro*. Rev. Peru. Biol. 13(3): 215 – 217.
- Alzamora, L.; Galván; P.; Alvarez, E.; Torres, D.; Colona, E.; Aliaga, M. y Marcelo, A. 2007b. Producción de IFN- $\gamma$  en cultivos de linfocitos humanos por efecto de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón (Brassicaceae) Rev. peru. biol. 13(3): 207 – 209.
- Boland, G., Beran, M., Lievens, J., Sasadeusz, P., Nothdurft, H., Zuckerman, J.N., Genton, R., Steffen, R., Loutan, J., Van Hattum, J., Stoffel, M. 2004. Safety and immunogenicity of an experimental hepatitis B vaccine adjuvanted with AS04. Vaccine 24: 316-320.
- Cabezas, C. 2002. Hepatitis Virales B y Delta: Epidemiología y Prevención en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública 19 (3): 150-161.

- Chacón, G. 1961. Estudio Fitoquímico de *Lepidium meyenii* Walp. Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.
- Chacón, G. 1990. La Maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. Nov.) y su Habitat. Rev. Per. Biol. 3 (2): 169 – 272.
- Chisari, F.V. 1995. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev Immunol 13: 29–60.
- Cicero, A. F. G., Piacente, S., Plaza, A., Sala, E., Arletti, R. y Pizza, C. 2002. Hexanic Maca extract improves rat sexual performance more effectively than methanolic and chloroformic Maca extracts. Andrología 34 (3): 177 – 179.
- Cui, B., Zheng, B., He, K. y Zheng, Q. 2003. Imidazole Alkaloids from *Lepidium meyenii*. J. Nat. Prod 66: 1101-1103.
- Dante, J. 2003. Vaccine adjuvants: role and mechanism of action in vaccine immunogenicity. Drug Discovery Today 3 (20): 934-943.
- Desombere, I., Gijbels, Y., Verwulgen, A., Leroux, G. 2000. Characterization of the T cell recognition of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by good and poor responders to hepatitis B vaccines. Clin Exp Immunol 122: 390-399.
- Dini, A., Migliuolo, G., Rastrelli, L., Saturnino, P., Schettino, O. 1994. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. Food Chemistry 49: 347-349.
- Dorsch, W., Stuppner, H., Wagner, H., Gropp, M., Demoulin, S., Ring, J. 1991. Antiasthmatic effects of *Picrorhiza kurroa*, Androsin prevents allergen and PAV-induced bronchial obstruction in guinea pigs. Int Arch Allergy Appl Immunol 95: 128-138.
- Ebina, T., Fujiyama, Y. 1998. Antitumor effect of a peptide-glucan preparation extracted from *Agaricus blazei* Murill in a double-grafted tumor system in mice. Biotherapy 11.

- Egger, S. F., Brown, G. S., Kelsey, L. S., Yates, K. M., Rosenberg, L. J., Talmadge, J. E. 1996. Hematopoietic augmentation by a h-(1,4)-linked mannan. *Cancer Immunol Immunother* 43:195–205.
- Esser, M. T., Marchese, R. D., Kierstead, L. S., Tussey, L. G., Wang, F., Chirmule, N., Washabaugh, M. W. 2003. Memory T cells and vaccines. *Vaccine* 21: 419–430.
- Ganem, D., Proce, A.M. 2004. Hepatitis B virus infection – natural history and clinical consequences. *N Engl J Med* 350: 1118-1129.
- Ganzera, M., Zhao, J., Muhammad, I., Khan, I.A. 2002. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by reversed phase high performance liquid chromatography. *Chem. Pharm. Bull* 50: 988-991.
- Garro, V., León, E., Julia, B. 1993. Extracción, separación e identificación por Cromatografía de Alcaloides de *Lepidium meyenii* Walp (“Maca”). Instituto de Química Orgánica Aplicada a la Farmacia y Bioquímica. UNMSM. VI Congreso Peruano de Farmacia y Bioquímica.
- Gonzales, G.F., Ruiz, A., Gonzales, C., Villegas, L., Cordova, A. 2001a. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian Journal of Andrology* 3: 231–233.
- Gonzales, G.F., Cordova, A., Gonzales, C., Chung, A., Vega, K., Villena, A. 2001b. Improved sperm count after administration of *Lepidium meyenii* (Maca) in adult men. *Asian Journal of Andrology* 3: 301–304.
- Halpern, M.D., Kurlander, R.J., Pisetsky, D.S. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol* 167:72.
- Igor, A., Schepetkin, Mark, T., Quinn, H. 2006. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology* 6: 317– 333.



- Iori, R., Rollin, P., Streicher, H., Thiem, J., Palmieri, S. 1996. The myrosinase-glucosinolate interaction mechanism studied using some synthetic competitive inhibitors. *FEBS Lett* 385:87–90.
- Iyer, S., Robinett, R., HogenEsch, H., Hem, S. 2004. Mechanism of adsorption of hepatitis B surface antigen by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine* 22: 1475-1479.
- Kardar, G., Tehrani, J., Shokri, F. 2002. Diminished Th1 and Th2 cytokine production in healthy adult nonresponders to recombinant hepatitis B vaccine. *Scand J Immunol* 5:311-314.
- Keating, G.M., Noble, S., 2003. Recombinant hepatitis B vaccine. *Drugs* 63: 1021-1051.
- Khajuria, A., Gupta, A., Singh, S., Malik, F., Singh, J., Suri, K., Satti, N., Qazi, G., Srinivas, V., Ella, K. 2006. RLJ-NE-299<sup>a</sup>: A new plant based vaccine adjuvant. *Vaccine* 25 (14): 2706-2715.
- Lee, W.M. 1997. Hepatitis B virus infection. *The New England Journal of Medicine* 337: 1733-1745.
- Lepetic, A., Biscayart, C., Seigelchifer, M., Arduino, R., Stambulian, D. 2003. Persistence of immunity and seroprotection 4 years after a primary vaccination schedule with *Hansenula polymorpha* recombinant hepatitis B vaccine. *Vaccine* 21: 4481-4485.
- Leroux-Roels, G., Desombere, I., De Tollenaere, G., Petit, M.A., Desmons, P., Hauser, P. 1997. Hepatitis B vaccine containing surface antigen and selected pre-S1 and pre-S2 sequences. Safety and immunogenicity in young healthy adults. *Vaccine* 15 (16): 1724-1731.
- Lewis, D.J., Eiden, J.E., Goilav, C., Langenberg, A.G., Suggett, F., Griffin, G.E. 2003. Rapid and frequent induction of protective immunity exceeding UK,

recommendations for healthcare settings by MF59- adjuvated hepatitis B vaccine. *Commun Dis Public Health* 6 (4): 320–324.

- Liu, G., Anderson, C., Scaltreto, H., Barbon, J., Kensil, C. 2002. QS-21 structure function studies: effect of acylation on adjuvant activity. *Vaccine* 20: 2808-2815.
- May, J.C., Progar, J.J., Chin, R. 1984. The aluminium content of biological products containing aluminium adjuvants: determination by atomic absorption spectrometry. *J Biol Stand* 12: 175-183.
- McDermott, A., Cohen, S., Zuckerman, J., Madrigal, J. 1999. Human leukocyte antigens influence the immune response to a pre-S/S hepatitis B vaccine. *Vaccine* 17: 330-339.
- Medina, E., Guzman, C.A. 2000. Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27 (4): 305–311.
- Mora, P., Dominguez, R., Duque, E., Martínez, L., Escoto, J., Jacobo, O. 2006. Adjuvants: Present regulatory challenger. *Vaccine* 24 S2: S88-S89.
- Morris, S.L., Brennan, M.J., Collins, F.M. 1999. Propelling novel vaccines directed against tuberculosis through the regulatory process. *Tuber Lung Dis* 79 (3):145-51.
- Muhammad, I., Zhao, J., Dunbar, D.C., Khan, I.A. 2002. Constituents of *Lepidium meyenii* “maca”. *Phytochemistry* 59: 105-110.
- Nakajima, A., Ishida, T., Koga, M., Takeuchi, T., Mazda, O. 2002. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. *Int Immunopharmacol* 2: 1205–1211.
- Obregón, L. D. 1998. Maca. Lima: Instituto de Fitoterapia Americana.
- Ochoa, C. y D. Ugent, 2001. Maca (*Lepidium meyenii* Walp Brassicaceae): A nutritious rootcrop of the central Andes. *Economic Botany* 55(3): 344-345.

- O'Hagan, D.T., MacKichan, M.L., Singh, M. 2001. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng* 18: 69–85.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Department of Vaccines and Biologicals. 2001. Introduction of hepatitis B vaccine into childhood immunization services <<http://www.who.int/immunization/en/>>. Acceso 24/10/2006.
- Perez J., Isaza, G., Bueno, J., Arango, M., Hincapié, B., Nieto, A. y Londoño, D. 2004. Efecto de los extractos de *Phenax rugosus*, *Tabebuia chrysantha*, *Althernantera williamsii* y *Solanum dolichosepalum* sobre el leucograma y la producción de anticuerpos en ratas. *Rev Med Risaralda* 10(2): 13 – 21.
- Raychaudhuri, S., Morrow, W.J.W. 1993. Can soluble antigens induce MHC class I restricted immune response? A paradox revisited. *Immunol* 14: 344-348.
- Regev, A. 2000. Viral Hepatitis A, B and C. *Clinics in Liver Disease*. 4: 1-26.
- Reyes, S., Tamez, G., Rodríguez, P., Tamez, P., Weber, R., Gómez, R., Calderón, L. 2001. Activación de macrófagos y linfocitos in vitro por extractos metanólicos de hojas de *Plantago major*. *CIENCIA UANL* 4 (3): 304-313.
- Roy, M. J., Wu, M. S., James, L., Fuller, J. T., Tussey, L. G., Speller, S., Culp, J., Burkholder, J. K., Swain, W. F., Dixon, R. M., Widera, G., Vessey, R., King, A., Ogg, G., Gallimore, A., Haynes, J. R., Heydenburg, D. 2001. Induction of antigen-specific CD8+ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccines. *Vaccine* 19: 764-778.
- Rubio, J.; Ríqueros, M.; Gasco, M.; Yucra, S.; Miranda, S. y Gonzales, G. F. 2006. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-Damage on reproductive function in male rats. *Food and Chemical Toxicology* 44(7): 1114 – 11122.
- Sanchez, L.; Panduro, A. 2005. Genómica y proteómica del virus de la Hepatitis B. *Investigación en Salud* 7: 12-18.

- Sandoval, M.; Okuhama, N.; Angeles, F.; Melchor, V.; Condezo, A.; Lao, J., Millar, M. 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). Food Chemistry 79: 207-213.
- Schepetkin, I.A., Faulkner, C.L., Nelson-Overton, L.K., Wiley, J.A., Quinn, M.T. 2005. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. Int Immunopharmacol 5:1783-99.
- Sharma, M.L., Rao, C.S., Duda, P.L. 1994. Immunostimulatory activity of *Picrorhiza kurroa* leaf extract. J Ethnopharmacol 41: 185-192.
- Song, J.Y., Yang, H.O., Pyo, S.N., Jung, I.S., Yi, S.Y., Yun, Y.S. 2002. Immunomodulatory activity of protein-bound polysaccharide extracted from *Chelidonium majus*. Arch Pharm Res 25: 158-164.
- Takx-Kohlen, B.C. 1992. Immunomodulators. Future prospects. Pharm Weekbl Sci 14: 24-52.
- Tamura, M., Yoo, G.C., Yoshimatsu, K., Yoshida, R., Oka, T., Ohkuma, K., 1995. Effects of muramyl dipeptide derivatives as adjuvants on the induction of antibody response to recombinant hepatitis B surface antigen. Vaccine 13: 77-82.
- Tellez, M., Khanb, I., Kobaisya, M., Schradera, K., Dayana, F., Osbrinkc, W. 2002.
- Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp.). Phytochemistry 61: 149-155.
- Tillán, J., Rodríguez, J., Gómez, J., Pardo, Z. y Agüero, F. 2004. Actividad antianémica de la *Cassia grandis* L. Rev Cubana Farm 38 (3).
- Valerio, L.G., Gonzales, G.F. 2005. Toxicological aspects of the South American herbs Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*). A critical synopsis. Toxicological Reviews 24: 11-35.
- Vandervelde, E.M. Mortimer, P.P. 1985. New Hepatitis Vaccines. BMJ 290: 787.

- Vandepapeliere, P., Rehmann, B., Koutsoukos, M., Moris, P., Garcon, N., Wettendorff, M., Leroux-Roels G. 2004. Potent enhancement of cellular and humoral immune responses against recombinant hepatitis B antigens using AS02A. *Vaccine* 21: 3179-3185.
- Yang, Y.W., Sheik, N.A., Morrow, W.J.W. 2002. The ultrastructure of tomatitine adjuvant. *Biomaterials* 23: 4677-4686.
- Yllesca, M. 1994. Estudio Químico y Fitoquímico comparativo de 3 ecotipos de *Lepidium meyenii* Walp. “Maca” procedentes de Carhuamayo (Junín). Tesis. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Zhang, Y., Yu, L., Ao, M., Jin, W. 2006. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. *Journal of ethnopharmacology* 105: 274 - 279.
- Zheng, B.L. 2000. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 55: 598 – 602.

## ANEXOS

### 1. COMPONENTES DEL KIT DE ELISA BIOELISA-BIOKIT

1. Microplaca: Pocillos recubiertos con HBsAg purificado de plasma humano e inactivado.
2. Conjugado: HBsAg purificado de plasma humano e inactivado, conjugado con peroxidasa. Contiene colorante rojo, proteínas estabilizadoras y mertiolato sódico al 0.02%.
3. Solución de lavado: Tampón fosfato que contiene Twen 20 al 1% y merthiolato sódico 0.01%.
4. Tampón sustrato: Tampón citrato-acetato que contiene peróxido de hidrógeno.
5. Cromógeno: 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). Contiene colorante rojo.
6. Calibrador positivo alto: Anticuerpos Ig G de conejo anti-HBs diluido en tampón fosfato. Contiene colorante verde, proteínas estabilizadoras y azida sódica al 0.02%.  
Concentración = 100 mUI/mL de anti-HBs. Calibrado frente a la primera preparación de referencia de la OMS para inmunoglobulina anti-HBs suministrada por el Laboratorio Central de Servicio de Transfusiones Sanguíneas (CLB) de Amsterdam, Holanda.
7. Calibrador positivo bajo: Anticuerpos Ig G de conejo anti-HBs diluido en tampón fosfato. Contiene colorante verde, proteínas estabilizadoras y azida sódica al 0.02%.  
Concentración = 10 mUI/mL de anti-HBs. Calibrado frente a la primera preparación de referencia de la OMS par inmunoglobulina anti-HBs suministrada por el Laboratorio Central de Servicio de Transfusiones Sanguíneas (CLB) de Amsterdam, Holanda.
8. Control negativo: Suero humano diluido negativo para todos los marcadores serológicos del virus de la hepatitis B. Contiene colorante amarillo y azida sódica al 0.02%.
9. Solución de parada: Ácido sulfúrico 1N.

## 2. REACTIVO DE GRISS

Solución A:	Ácido sulfanílico	2.8 g
	Agua destilada	250 ml
	Ácido acético glacial	100 ml

Solución B:	Dimetil – naftilamina	2.1 g
	Agua destilada	250 ml
	Ácido acético glacial	100 ml

- Agregar al medio de cultivo 1 o 2 gotas de ambas soluciones. El ácido sulfanílico y el nitrito reaccionan formando una sal diazoica (ácido sulfanílico diazotizado), la sal diazoica acoplada a la naftalina produce un colorante “azo” rojo, soluble en agua.
- La formación de color rojo, después de la adición de las dos soluciones, indica que el nitrito está presente en el medio.