

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**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 de Biólogo

AUTOR

Evelyn Katy Alvarez Salazar

ASESOR

Libertad Alzamora Gonzáles

Lima – Perú

2008

Asesora: Dra. Libertad Alzamora González
Profesora Principal de la Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

“Los muchachos se fatigan y se cansan, los jóvenes flaquean y caen; pero los que esperan a Jehová tendrán nuevas fuerzas; levantarán alas como las águilas; correrán, y no se cansarán; caminarán, y no se fatigarán”

AGRADECIMIENTOS

Son tantas las personas que me apoyaron en la realización de esta tesis que no podré mencionar a todos, no solo en lo intelectual sino también amical, con una sonrisa o una frase de aliento, es suficiente para sentirme eternamente agradecida.

A la profesora Libertad Alzamora, por su apoyo incondicional y confianza en mi persona para la realización de esta tesis, con disciplina y responsabilidad, por su paciencia, cariño y consejos en los momentos más difíciles.

Al profesor Colona por su amistad, buen sentido del humor y enseñanza en el laboratorio.

A Dina Torres y Ricardo Laguna por apoyarme hasta altas horas de la noche en la crianza y evaluación experimental de los ratones.

A mis padres Uldarico y Dionicia quienes con cariño me dieron su confianza y constante aliento.

A mis hermanas Elizabeth y Rosa por su gran amistad y por compartir todos los momentos de mi vida.

A los doctores Fredy Carrasco y Manuela Zúñiga por brindarme todas las facilidades para terminar de redactar el borrador de tesis.

A mis amigos del laboratorio Natura, Inmunología y todos los que fueron llegando a mi vida, por su compañía y gratos momentos compartidos.

Y ante todo a Dios, quien fue mi clave para seguir adelante y no desanimarme cuando la situación se tornaba difícil.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	6
ANTECEDENTES	8
MATERIAL Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	21
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
TABLAS Y FIGURAS	54
ADDENDA	74

RESUMEN

Lepidium peruvianum (maca), es un cultivo tradicional de los Andes Centrales del Perú y es empleada desde tiempos precolombinos como una planta medicinal y alimenticia. Los cultivares de maca se diferencian por el color externo de la raíz denominándose a cada uno como ecotipo. Estudios anteriores reportaron que los diferentes ecotipos de maca presentan diferencias en cuanto a su actividad biológica.

Los objetivos del presente estudio fueron: Determinar la concentración de flavonoides, calcio y hierro en el extracto metanólico (EM) de los ecotipos blanco, morado, rojo y negro; comprobar la actividad moduladora del EM de los ecotipos blanco, morado, rojo y negro sobre la respuesta inmune humoral *in vivo* frente a los glóbulos rojos de carnero (GRC) en animales normales e inmunosuprimidos con ciclofosfamida (CF), así como su efecto sobre el peso y celularidad de los órganos linfoides y recuento de las células sanguíneas. Finalmente, determinar la producción de óxido nítrico (ON) por macrófagos peritoneales cultivados con el EM de los ecotipos seleccionados.

Se determinaron las concentraciones de flavonoides, calcio y hierro en el EM de los ecotipos seleccionados. Se emplearon ratones machos Swiss y en todos los ecotipos la dosis de EM fue de 300 mg/kg de peso corporal; se obtuvieron los valores de pesos corporales y de órganos, celularidad del bazo, timo y médula ósea, recuento de células sanguíneas y nivel de anticuerpos hemaglutinantes y hemolíticos, de cada espécimen de los diferentes grupos y de sus controles. Se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones inoculados con caldo tioglicolato por vía intraperitoneal y la dosis de EM fue de 800 µg/ml por ecotipo; se determinó la producción de ON por acumulación de nitrito en el medio de cultivo. Los resultados se analizaron usando el paquete estadístico SPSS y las diferencias entre los grupos se determinaron aplicando el análisis de varianza Levene y la prueba T de Student.

El extracto metanólico de los ecotipos blanco, morado y rojo registraron las mayores concentraciones de flavonoides y hierro. El extracto metanólico ecotipo morado registró la mayor concentración de calcio. La ciclofosfamida afectó la producción de anticuerpos en los ratones. Se evidenció la modulación de la respuesta inmune humoral en animales inmunosuprimidos y tratados con el EM. Se observó el incremento de peso y celularidad del bazo y timo en los ratones tratados con el EM ecotipo morado. El EM ecotipo rojo favoreció significativamente la producción de eritrocitos e incrementó la actividad locomotora en el 100% de los ratones. El EM de los ecotipos blanco, morado y rojo favoreció el recuento de las células sanguíneas ofreciendo protección frente a la mielosupresión inducida por ciclofosfamida; asimismo la producción de anticuerpos hemolíticos fue significativamente superior en los animales tratados con el EM ($p < 0.05$). El EM ecotipo blanco favoreció la producción de anticuerpos hemaglutinantes. El EM ecotipo negro no favoreció la respuesta inmune en los animales inmunosuprimidos. El EM de los ecotipos blanco, morado, rojo y negro a la dosis de 800 $\mu\text{g/ml}$ no indujeron la producción de ON al compararlos con el control, aunque el ecotipo morado fue superior ($p > 0.05$).

El EM de los ecotipos blanco, morado, rojo y negro presentan diferencias en cuanto a la actividad moduladora de la respuesta inmune.

Palabras clave: Inmunomodulación, maca, *Lepidium peruvianum*, ecotipo, extracto metanólico, macrófagos peritoneales

ABSTRACT

Lepidium peruvianum (maca) is a traditional crop in the Central Andes from Peru, it is well-known and employed from pre-Columbian times as a medicinal and nutritional plant. Maca is presented in different ecotypes according to colors of its roots. Previous studies reported that the different ecotypes from maca display differences in their biological activity.

The objectives of the present study were: To determine flavonoids, calcium and iron concentration in methanolic extract (EM) of white, purple, red and black ecotypes, to verify the modulatory activity of the methanolic extract of the white, purple, red and black ecotypes on the humoral immune response in mice to sheep red blood cells (SRBC) in normal and immunosuppressed animals with cyclophosphamide (CP), as well as its effect on the weight and cellularity of the lymphoid organs and peripheral blood cell count. Finally to evaluate the activity of the methanolic extracts of the selected ecotypes on the nitric oxide (NO) production by peritoneal macrophages.

The concentrations of flavonoids, calcium and iron in EM of the selected ecotypes were determined. Male mice Swiss were used and in all the ecotypes the dose was 300mg/kg body weight and the values of body and organs weights were obtained, cellularity of spleen, thymus and bone marrow and blood cells count, each one specimen of the different groups and its controls. Peritoneal macrophages were obtained of mice inoculated with tioglicolato broth by intraperitoneal route and the dose was 800 µg/ml by ecotype; the nitric oxide production was determined by accumulation of nitrite in culture. The results were analyzed using SPSS statistical package and the differences between the groups were determined applying to the analysis of Levene variance and test T Student.

The methanolic extract of the white, purple and red ecotypes registered the greater concentrations of flavonoids and iron. The methanolic extract from purple

ecotype registered the greater calcium concentration. The cyclophosphamide affected the production of antibodies in the mice. The modulation of the humoral immune response in immunosuppressed animals and deal with EM was demonstrated. It was observed the increase of weight and cellularity of spleen and thymus in the mice dealt with EM purple ecotype. The EM red ecotype favored the production of eritrocytes significantly and increased the locomotive activity in the 100% of the mice. The EM of the white, purple and red ecotypes favored the of the blood cells count; also the production of hemolytic antibodies was significantly superior in the treated animals ($p<0.05$). The EM white ecotype favored the production of hemaglutinantes antibodies. The EM black ecotype did not favor the immune response in the immunosuppressed animals. The methanolic extract of the white, purple, red and black ecotypes to the 800 dose of $\mu\text{g/ml}$ not induced the NO production when are compared with control, although purple ecotype was superior ($p>0.05$).

The EM of the ecotypes white, purple, red and black presents differences in their modulatory activity on the immune response.

Key words: Immunomodulation, maca, *Lepidium peruvianum*, ecotype, methanolic extract, peritoneal macrophage.

ABREVIATURAS

GMT	Media geométrica
CF	Ciclofosfamida
EM	Extracto metanólico
GRC	Glóbulos rojos de carnero
CT	Caldo tioglicolato
IS	Inmunosuprimidos
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
ip	Vía intraperitoneal
ON	Óxido Nítrico

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es el encargado de defender al organismo de los agentes agresores que se encuentran a nuestro alrededor. El sistema inmune debe mantener su equilibrio y capacidad de respuesta, ya que su alteración puede ser la base de un importante número de enfermedades (Abbas *et al.*, 2002). La modulación de la respuesta inmune ya sea estimulándola o suprimiéndola, puede ayudar a mantener un estado libre de enfermedades. La búsqueda de agentes inmunomoduladores que regulen y lleven al equilibrio el sistema inmune ha suscitado interés durante mucho tiempo (Dahanukar *et al.*, 2000). Muchas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional han demostrado poseer actividades inmunomoduladoras, mejorando considerablemente los mecanismos inmunológicos encargados de combatir las células malignas y proteger al organismo de las infecciones (Atal *et al.*, 1986; Hoareau, L. y Da Silva, E. 1999; Perez *et al.*, 2004).

Lepidium peruvianum (maca) es una especie nativa adaptada a las condiciones extremas existentes en los pisos ecológicos más altos de la cordillera de los Andes Centrales del Perú. La porción comestible de esta planta es la raíz, que presenta hasta 13 colores distintos denominándose a cada uno como ecotipo. La maca es conocida y empleada desde tiempos precolombinos como una planta medicinal y alimenticia, donde la medicina tradicional peruana hace mención de sus principales propiedades como aumento de la fertilidad, afrodisíaca, revitalizante y reguladora (Obregón L. 1998). Esta planta nativa además ha mostrado capacidad para estimular la respuesta inmune tanto humoral como celular. Se reportó que la administración oral del extracto clorofórmico de maca, ecotipo amarillo en ratones Balb/c, condujo a un incremento del título de anticuerpos, de la capacidad fagocítica y favorece la recuperación de la respuesta celular natural en animales inmunosuprimidos. Resultados similares se obtuvieron con el extracto acuoso. Además se evidenció que el extracto clorofórmico estimula la producción de óxido nítrico en cultivo de macrófagos peritoneales (Alzamora, L. 2003; Alzamora *et al.*, 2003; 2004).

En un estudio en el que se evaluó el efecto del extracto acuoso de maca, ecotipo: amarillo, negro y rojo en ratas, se encontró que solo el ecotipo rojo redujo significativamente el tamaño de la próstata y revertió el efecto deletéreo del enantato de testosterona al compararla con el control (González *et al.*, 2005). Por otra parte, los mejores efectos reproductivos se obtuvieron con el ecotipo negro, que favoreció en mayor medida el número y movilidad de los espermatozoides (González *et al.*, 2006). Es probable que los diferentes ecotipos de maca presenten diferencias en cuanto a su actividad inmunomoduladora por lo que es necesaria una evaluación comparativa de los ecotipos más representativos para tener una información más completa y exacta sobre dichas propiedades, con el fin de contribuir en la investigación de esta planta nativa peruana y dimensionar adecuadamente su potencial terapéutico.

Por estas razones, la presente investigación consideró plantear los siguientes objetivos:

A. Objetivo General

Determinar el efecto modulador del extracto metanólico obtenido de las raíces de *Lepidium peruvianum*, ecotipos: blanco, morado, rojo y negro, sobre la inmunidad humoral y celular en ratones.

B. Objetivos Específicos

1. Determinar la concentración de flavonoides, calcio y hierro en el extracto metanólico de los ecotipos seleccionados.

Evaluación de la respuesta inmune humoral

1. Demostrar el efecto del extracto metanólico de los ecotipos seleccionados sobre el peso y celularidad de los órganos linfoides.
2. Demostrar la influencia del tratamiento con los extractos sobre el recuento de células sanguíneas.
3. Demostrar la actividad inmunomoduladora del extracto metanólico de los ecotipos seleccionados sobre la producción de anticuerpos.

Evaluación de la respuesta inmune celular

1. Determinar la producción de óxido nítrico por macrófagos peritoneales cultivados con el extracto metanólico de los ecotipos seleccionados.

ANTECEDENTES

Lepidium peruvianum (maca) es un cultivo tradicional en los Andes Centrales Peruanos, que crece y se desarrolla en los ecosistemas de Suni y Puna de los departamentos de Junín y Pasco, en altitudes que oscilan desde los 3700 hasta los 4450 m. Es una planta que se caracteriza por su alta tolerancia a las heladas, comparable a los pastos naturales (Obregón L. 1998). Existen indicios que el cultivo de la maca data desde la prehistoria y algunos afirman que su cultivo y producción fue bastante extensa, fundamentalmente a lo largo de los Andes Peruanos y Bolivianos. Sin embargo, hasta hace pocos años, su distribución se vio reducida a un pequeño número de distritos y localidades, correspondientes a los pisos ecológicos de Suni y Puna de los departamentos de Junín y Pasco. Recientemente, su cultivo se está extendiendo a otros departamentos como Huancavelica, Ayacucho, Apurímac, Cusco y Puno (Arana, M. 2005)

Los cultivares de maca que existen en la actualidad se diferencian principalmente por el color externo de la raíz, que pueden ser blanco, amarillo, negro, rojo y morado denominándose a cada uno como ecotipos. Se entiende como ecotipo a un grupo dentro de una especie que presenta características distintas, resultado de su adaptación al medio local. Las características propias de la maca se relacionan con las raíces que exhiben una variedad de colores. La variación de colores se debe quizás a la fuente de nutrientes que tiene la tierra, especialmente los minerales que presenta. Entre los cultivares de maca existen también, sub-categorías descritas que se diferencian por sus intensidades y distribuciones en la corteza; en una muestra de 758 plantas del departamento de Junín se encontró hasta 13 diferentes ecotipos. La diversidad de esta coloración que es sólo externa, se debe principalmente a la presencia de antocianinas y probablemente a xantofila (Fuertes *et al.*, citado por Obregón, 1998).

El valor nutricional de la maca es alto, comparable al de los cereales como maíz, arroz y trigo y superando en contenido calórico, proteínas y carbohidratos a otros

vegetales. En 1968 se realizó el primer estudio de macronutrientes de la maca, ecotipo amarillo y se encontró que presenta un contenido proteico superior a otras raíces y tubérculos, además de altos valores de calcio y hierro (Baquerizo, G. citado por Obregón L. 1998).

En cuanto a los metabolitos secundarios, las investigaciones fitoquímicas realizados en esta planta nativa peruana, mencionan principalmente:

- **Alcaloides**, hasta 4 fracciones: macaína 1, 2, 3 y 4. Recientemente se les identificaron como: (1R,3S)-1 methyltetrahydro- β -carboline-3-oic-acid, benzylated 1,2-dihydro-N-hidroxypyridine derivative (macaridine) y dos alcaloides imidazoles, 1,3-dibenzyl-4,5-dimethylimidazolium chloride (lepidilin A) y 1,3-dibenzyl-2,4,5-trimethylimidazolium chloride (lepidilin B) (Valentová y Ulrichová, 2003; Bianchi, A. 2003; Piacente *et al.*, 2002; Cui *et al.*, 2003; Muhammad *et al.*, 2002).
- **Glucosinolatos**, identificados como: Benzylglucosinolato (Glucotropaeolin) y m-methoxybenzylglucosinolato (Dini *et al.*, 2002; Piacente *et al.*, 2002). Otros investigaciones afirman la presencia de hasta ocho glucosinolatos (Valentová y Ulrichová, 2003).
- **Isotiocianatos**, producto de la hidrólisis de los glucosinolatos, por acción de la mirosinasa. Son responsables del fuerte olor y sabor picante de la maca.
- **Macaene y Macamidas** (alkamidas benziladas) (Muhammad *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2005).

Además de los esteroides (fitoesteroles), antocianinas, flavonoides, taninos y saponinas.

La maca es conocida y empleada desde tiempos precolombinos principalmente como una planta medicinal y alimenticia, donde la Medicina Tradicional Peruana hace mención de sus principales propiedades como aumento de la fertilidad, afrodisíaca,

revitalizante y reguladora; por lo que se han realizado muchos estudios de la maca generalmente con el ecotipo amarillo: Aumento del número de crías, incremento del número de folículos de Graff, aumento en el número de intromisiones completas, incremento en el número de espermatozoides (Cicero *et al.*, 2002; Obregón, L. 1998). Además, estudios realizados en ratas demostraron que la maca revierte parcialmente el efecto deletéreo de acetato de plomo y de la altura sobre la espermatogénesis (Rubio *et al.*, 2006; Gonzáles *et al.*, 2004). En humanos se demostró que mejora el conteo de espermatozoides y su movilidad, y tiene un efecto estimulante del deseo sexual en varones adultos; se reportó además, que los efectos reproductivos de la maca son independientes de los cambios hormonales, puestos que estos no se modifican (Gonzáles *et al.*, 2003). También se reportaron que la maca favorece la tasa de crecimiento y supervivencia de peces juveniles (Lee *et al.*, 2005) y que presenta un efecto favorable para el tratamiento de la osteoporosis, al mejorar la densidad ósea y restaurar la red trabecular en un modelo de ratas ovariectomizadas (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), además de no ejercer efectos citotóxicos en cultivos de hepatocitos con concentraciones crecientes de maca (Valentová *et al.*, 2006).

Esta planta también ha demostrado poseer actividades inmunomoduladoras, estimulando tanto la respuesta inmune humoral y celular (Alzamora, L. 2003; Alzamora *et al.*, 2003; 2004; 2007).

La respuesta inmune humoral está mediada por los linfocitos B, que reconocen al antígeno a través de sus inmunoglobulinas de membrana. El elemento efector final de la respuesta humoral son los *anticuerpos*. Tras la unión antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), las sustancias extrañas (o antígenos) son neutralizadas o eliminadas por diversos mecanismos mediante su opsonización y fagocitosis o activando el sistema de complemento. El sistema de complemento, consiste en un conjunto de proteínas plasmáticas que actúan a nivel humoral, cuyos productos finales producen la lisis de los microorganismos (Francois, J. 1984; Abbas *et al.*, 2002).

La respuesta inmune celular cubre una importante función como mecanismo inmunológico de defensa, actuando principalmente frente a bacterias y virus, así como evitando la aparición y desarrollo de células tumorales. Los linfocitos T reconocen al antígeno mediante su *receptor* TcR, para esto el antígeno debe ser procesado en el interior de las *células presentadoras de antígeno* (APC) y sus determinantes antigénicos ser expuestos en la superficie de estas células mediante el *complejo mayor de histocompatibilidad* (Francois, J. 1984; Abbas *et al.*, 2002).

Los macrófagos proporcionan señales esenciales para la iniciación de la respuesta humoral y celular, además de cumplir un papel importante en el desarrollo de la inmunidad innata. Cuando estas células son activadas ya sea por efecto de citoquinas pro-inflamatorias o infecciones con microorganismos, liberan óxido nítrico (NO) y otros intermediarios reactivos del oxígeno, responsables de su actividad citotóxica y citostática contra microorganismos infecciosos y células tumorales (Tamez *et al.*, 2001; Ignacio *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que la administración oral del extracto clorofórmico de maca, ecotipo amarillo en ratones Balb/c, condujo a un incremento del título de anticuerpos, de la capacidad fagocítica y favoreció la recuperación de la respuesta celular natural en animales inmunosuprimidos con metilprednisona. Resultados similares se obtuvieron con el extracto acuoso. Además, se evidenció que el extracto clorofórmico estimula la producción de óxido nítrico en cultivo de macrófagos peritoneales (Alzamora *et al.*, 2003; 2004).

Se determinó los compuestos químicos de tres ecotipos de maca: amarillo, rojo y negro, tanto en sus componentes nutritivos como sus metabolitos secundarios. Los tres ecotipos de maca presentaban menor variación en el contenido de nutrientes: proteínas, grasa, fibras, cenizas y carbohidratos; sin embargo, en las vitaminas y minerales como calcio y hierro, las variaciones se daban en considerables proporciones. Además, los ensayos fitoquímicos señalaban que el ecotipo rojo presentaba mayor contenido de flavonoides que los otros dos ecotipos estudiados (Yllesca, M. 1994).

Recientemente, se reportaron que los ecotipos de maca presentan diferencias en cuanto a su actividad biológica. Un estudio en el que se evaluó el efecto del extracto acuoso de maca, ecotipo: amarillo, negro y rojo en ratas encontró que solo el ecotipo rojo redujo significativamente el tamaño de la próstata y revertió el efecto deletéreo del enantato de testosterona al compararla con el control (González *et al.*, 2005). Además, los mejores efectos reproductivos se obtuvo con el ecotipo negro, que parece favorecer en mayor medida el número y movilidad de los espermatozoides (González *et al.*, 2006). Por otra parte, se reportó que el extracto metanólico ecotipo morado, seguido del blanco, presenta mayor actividad leishmanicida, esto fue determinado por la disminución del número de promastigotes al segundo día de exposición con los extractos (Alzamora *et al.*, 2007).

En cuanto a la actividad inmunomoduladora, se reportó que el extracto metanólico ecotipo morado de maca posee propiedades inmunoestimuladoras importantes, al inducir la producción significativa de Interferón γ (IFN γ) en cultivos de linfocitos T humanos de sangre periférica (Alzamora *et al.*, 2007)

MATERIAL Y MÉTODOS

I. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS

Se trabajó con raíces de maca procedentes del Valle de Pampas, Provincia de Tayacaja, Departamento de Huancavelica, las que fueron clasificadas por ecotipos según su color y teniendo en cuenta su forma y estado de conservación. Se seleccionaron cuatro ecotipos de maca color blanco, morado, rojo y negro (Figura 1).

Las raíces de maca se pulverizaron y maceraron en metanol QP durante 10 días (1:2 P/V respectivamente). El macerado se filtró empleando una bomba al vacío, se concentró en una estufa de aire circulante a 40°C hasta obtener $\frac{1}{4}$ del volumen inicial y se secó en una estufa a 40°C hasta total evaporación del solvente. El concentrado de cada ecotipo se depositó en pequeños viales debidamente rotulados y se guardó en la refrigeradora a 4°C.

II. ESTUDIO QUÍMICO DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS

1. Determinación de Flavonoides

Se pesaron 0.5 g del extracto metanólico (EM) de cada ecotipo y se colocaron en recipientes debidamente rotulados, se adicionó 9.5 ml de alcohol acidificado, preparado con una mezcla de etanol 95 % y HCl (1.5 N) en proporción de 85:15 (v/v). Se homogenizaron bien, procurando no dejar residuos en las paredes internas del recipiente. Cada recipiente se tapó con plastifilm, luego se llevaron a refrigeración durante toda una noche a 4°C. Al cabo del tiempo, cada macerado se filtró con papel Whatman N° 1, siendo el filtrado colectado en una fiola de 100 ml. Se procedió al lavado del papel filtro utilizando alcohol acidificado para arrastrar los pigmentos, hasta completar un volumen de 100 ml. Luego se tapó, se homogenizó y se almacenó cada muestra en oscuridad, a temperatura ambiente por dos horas.

Finalmente, las absorbancias de cada muestra fueron leídas a una longitud de onda de 374 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys), utilizando una cubeta de 1 cm³ y agua destilada como blanco (Figura 2).

Se realizaron los siguientes cálculos (Lees y Francis, 1972):

$$\text{Flavonoides Totales (mg/100 g)} = \frac{\text{Absorbancia} \times \text{Factor de Dilución}}{76,5}$$

2. Determinación de Hierro y Calcio

Se pesaron 0.5 g del EM de cada ecotipo y se colocaron en crisoles de porcelana previamente secos y pesados, debidamente rotulados. Luego, se colocaron los crisoles con las muestras en una mufla para la incineración y obtención de cenizas, a una temperatura de 800 °C por 2 horas. De las cenizas obtenidas, se pesaron 0,05 g en un matraz y se añadieron 0.95 ml de HCl concentrado. Luego, se llevó a una fiola y se enrasó a 100 ml con agua destilada. Se homogenizó completamente y se procedió a determinar la concentración de hierro y calcio según el procedimiento señalado en el protocolo de análisis del proveedor (Biosystems), para cada kit de trabajo.

Para la determinación de la concentración de Calcio se utilizó el Kit Calcio – MTB (Biosystems), las lecturas de absorbancia se midieron con un espectrofotómetro (Spectronic 20 Genesys), utilizando una cubeta de 1 cm³ y agua destilada como blanco, con 610 nm de longitud de onda.

La concentración de hierro se determinó usando el Kit Hierro – Ferrozina (Biosystems), cuyas absorbancias fueron obtenidas a 560 nm de longitud de onda.

La concentración de calcio y hierro se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Hierro/Calcio (mg/100 g de EM)} = \frac{\text{Absorbancia Muestra} \times \text{Concentración Standard} \times \text{FD} \times \text{CT}}{\text{Absorbancia Patrón} \times 0.05}$$

Donde:

FD = Factor de Dilución

CT = Cenizas Totales (g) del EM

EM = Extracto Metanólico

Las concentraciones de los Reactivos Standards son:

Reactivo Standard de Calcio = 10 mg/100 ml

Reactivo Standard de Hierro = 9 mg/100 ml

III. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL

1. Animales de Experimentación

Se utilizaron ratones albinos Swiss machos, de 6 semanas de edad, con pesos entre 25 y 28 gramos, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Todos los ratones fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura, humedad y luz y recibieron *ad libitum* agua y dieta de concentrado para animales (Purina®). El manejo de los animales se hizo basándose siempre en el código de ética sobre experimentación animal y en los principios éticos internacionales que guían la investigación biomédica con animales.

2. Inmunización e Inmunosupresión experimental

Se formaron 5 grupos de 6 ratones cada uno, por ecotipo, de acuerdo a la siguiente relación:

Grupo IS – EM. Inmunosuprimidos, inmunizados con GRC, recibieron tratamiento con EM.

Grupo IS – Sin EM. Inmunosuprimidos, inmunizados con GRC, no recibieron tratamiento con EM.

Grupo EM. No inmunosuprimidos, inmunizados con GRC, recibieron tratamiento con EM.

Grupo Sin EM. No inmunosuprimidos, inmunizados con GRC, no recibieron tratamiento con EM.

Grupo C. No inmunosuprimidos, no inmunizados con GRC, ni tratados con EM.

Con la finalidad de evaluar la respuesta inmune humoral, cuatro grupos (IS – EM, IS – Sin EM, EM y Sin EM) fueron inmunizados por vía intraperitoneal (ip) empleando 0.1 ml de glóbulos rojos de carnero (GRC) al 10%. Con la finalidad de inducir inmunosupresión en los animales, dos grupos (Grupo IS – EM e IS – Sin EM) recibieron una dosis de 50 mg/kg de peso corporal de ciclofosfamida (Endosan – Asta ®) contenida en 0.1 ml, por vía intraperitoneal, dos días después de la inmunización con GRC (Alzamora *et al.*, 2005). Se consideró un grupo de 6 ratones como control (Grupo C).

Se preparó una dilución del extracto metanólico (EM) en agua bidestilada estéril a una concentración de 300 mg/kg de peso corporal. La dosis de EM se aplicó por vía oral, contenida en un volumen de 0.1 ml y endulzada con azúcar rubia, para facilitar el consumo voluntario de la dosis y evitar de esa manera que los animales se estresen. A los ratones de los grupos IS – Sin EM, Sin EM y C se les suministró agua azucarada en un volumen similar al de los grupos IS – EM y EM.

El experimento tuvo una duración de 20 días, al cabo del tiempo los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para realizar los estudios respectivos. El protocolo de experimentación empleado se describe en la tabla 1.

3. Peso relativo de Órganos

Se pesaron los órganos (bazo, timo, hígado, testículos y vesículas seminales) utilizando una balanza analítica (Adam Equipment: ACB150). Los resultados se expresaron como peso relativo de órgano (peso órgano/100 g peso corporal).

4. Celularidad del Bazo, Timo y Médula Ósea

Se realizaron suspensiones celulares del bazo, timo y médula ósea, en medio RPMI-1640. Después de pesar los órganos linfoides y obtener las epífisis del fémur, estos fueron colocados de manera individual, sobre un tamiz en una placa petri, y cubiertos con otro tamiz, al cual se agregó 1ml de medio RPMI-1640 (Quality Biological, INC). Luego, se procedió a presionar el órgano con la ayuda de un émbolo para disgregar el tejido y liberar las células. Posteriormente, se tomó 10 µl de la suspensión que fue diluida, para un recuento más factible. La celularidad se determinó por recuento al microscopio utilizando una cámara de Neubauer. El recuento de células fue multiplicada por la inversa de su dilución para obtener la cantidad final.

5. Estudio hematológico

Las muestras de sangre se extrajeron por punción cardiaca y se colectaron de forma individual, en tubos con EDTA para ser procesadas mediante un contador hematológico (EC 10). Se evaluaron los siguientes parámetros hematológicos: recuento total y diferencial de leucocitos, reticulocitos, eritrocitos, hemoglobina y plaquetas.

6. Evaluación de la producción de anticuerpos hemaglutinantes y hemolíticos

Las muestras de sangre se extrajeron por punción cardiaca en tubos con gel por cada animal. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 rpm por 15 minutos para la obtención del suero.

Los niveles de anticuerpos hemaglutinantes (IgM) se determinaron mediante la técnica de hemaglutinación (Bin – Hafeez *et al.*, 2001). Se realizaron diluciones seriadas del suero (Factor 2) en solución salina 1X (Addenda 1) en un volumen final de 100 μ l en placas de microtitulación, a las que se añadieron 50 μ l de una suspensión de glóbulos rojos de carnero (GRC) en solución salina 1X al 0.5%. Una vez realizada la mezcla, las placas se incubaron a 37 °C en baño maría, durante una hora. Al cabo del tiempo, se examinaron las placas en busca de hemaglutinación. Se consideró como título de anticuerpos, la inversa de la dilución más alta que resultó positiva en aglutinación, por cada suero evaluado.

Los niveles de anticuerpos hemolíticos (IgM e IgG) se determinaron mediante la prueba de fijación del complemento (Rose y Friedman, 1980). Se realizaron diluciones seriadas del suero (Factor 4) en solución salina 1X en un volumen final de 200 μ l en tubos estériles, a las que se añadieron 50 μ l de una suspensión de GRC al 2 % y 50 μ l de complemento fresco de cobayo (10%). Se consideró como control positivo el reemplazo del suero por solución salina 1X y como control negativo el reemplazo por agua destilada, manteniendo siempre el mismo volumen. Una vez realizada la mezcla, los tubos se incubaron a 37 °C en baño maría, durante media hora. Al cabo del tiempo, los tubos se centrifugaron a 3500 rpm por 5 minutos. Se tomaron los sobrenadantes y se leyeron en una Lectora de Elisa (STAT FAX) a 540 nm. Para la determinación del CH50 se utilizó el programa estadístico SPSS 12, y se determinó la ecuación de regresión lineal para cada suero, considerando a sus diluciones como variables independientes (X) y a sus respectivas absorbancias como variables dependientes (Y). A dicha ecuación se reemplazó la variable Y por un valor estándar de absorbancia al 50% y se calculó el valor de X que corresponde a esa absorbancia, ese valor de X representa la dilución en que debe estar el suero para lisar el 50% de GRC presentes en la solución. Para calcular el valor estándar de absorbancia al 50%, se consideró como 0% de lisis la absorbancia obtenida por el control positivo, y como 100% de lisis lo registrado por el control negativo, extrapolarlo ambos valores se calculó la absorbancia correspondiente al 50% de lisis de GRC.

7. Peso corporal

Se llevó un registro semanal (cada 5 días) del peso corporal de cada ratón en todos los grupos tratados.

IV. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

1. Preparación de las dosis

Se empleó la dosis de 800 µg/ml. Para su preparación se pesó el extracto obtenido y se diluyó en medio RPMI-1640, el preparado se esterilizó empleando el filtro milipore 0,20 µ (CA – membrane). El filtrado de cada ecotipo se depositó en pequeños viales y se almacenó a 10 °C hasta su uso.

2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratones albinos Swiss machos, de 6 semanas de edad, con pesos entre 25 y 28 gramos, provenientes del bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Todos los ratones fueron mantenidos en condiciones estándar de temperatura, humedad y luz y recibieron *ad libitum* agua y dieta de concentrado para animales (Purina®).

3. Cultivos de Macrófagos peritoneales

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron de ratones, previamente inoculados con 1 ml caldo tioglicolato (MERCK) estéril por vía intraperitoneal (ip), tres días antes de la evaluación. Llegado el día, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Inmediatamente después, se realizó el lavado de la cavidad peritoneal con 3 ml de RPMI-1640, el volumen recolectado se depositó en tubos, se centrifugaron a 1000 rpm por 7 minutos. Los botones resultantes se resuspendieron en RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal 10%, penicilina (100U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml). Posteriormente, se dispensaron en viales de cultivo con tapa hermética,

conteniendo el extracto metanólico (EM) a la dosis de 800 µg/ml, se consideró como control los cultivos de macrófagos sin EM. Después, se incubaron durante 18 horas a 37°C. Los cultivos se realizaron por triplicado para cada ecotipo (Bird y Forrester, 1981; Alzamora, *et al.* 2004).

4. Medición de la concentración del nitrito

Al terminar el periodo de incubación se determinaron los niveles de nitrito de cada cultivo, por medio de la reacción de Griess. Para ello, se mezclaron 100 µl del sobrenadante de cada cultivo con 100 µl del Reactivo de Griess (50µl de Solución A + 50µl de Solución B) (Addenda 2). Se midió la absorbancia de la mezcla a 540nm, con un espectrofotómetro para microcelda (UNICO 1100 Spectrophotometer). La concentración de nitrito se determinó usando como estándar una curva de nitrito de sodio.

5. Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS (versión 12). Los resultados se expresaron como la media ± 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 $p < 0.05$.

RESULTADOS

I. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES, CALCIO Y HIERRO EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE MACA

El extracto metanólico (EM) ecotipo morado y blanco presentó la mayor cantidad de flavonoides, seguido del ecotipo rojo. En el EM ecotipo negro se registró los menores valores de flavonoides (Tabla 2 A).

La mayor concentración de calcio se registró en el EM ecotipo morado (237 mg/100 g EM), en menos cantidad se encuentran los ecotipos blanco y negro. Los ecotipos blanco y rojo, seguido del morado presentaron los mayores valores de hierro (Tabla 2 B).

II. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE MACA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

1. Ecotipo Blanco

a) Efecto de la dosis del Extracto metanólico sobre el comportamiento de los ratones

Los animales de los grupos EM y Sin EM se mostraron muy activos; luego del ejercicio, los ratones EM se alimentaron por más tiempo que los del grupo Sin EM. La inmunosupresión provocó cambios de conducta, los ratones se mantuvieron quietos y con poca actividad. Sin embargo los tratados con el extracto metanólico se recuperaron rápidamente y continuaron activos.

b) Peso relativo de Órganos

- **BAZO.** Los ratones del grupo IS – EM presentaron el menor peso promedio del bazo, solo fue significativa la diferencia con respecto a los grupos IS – Sin EM y EM ($p < 0.05$). Los pesos promedios del bazo entre los grupos EM y Sin EM no fueron estadísticamente significativos; tampoco se halló diferencia significativa entre los promedios de los grupos IS – Sin EM y Sin EM, aunque el grupo IS – Sin EM mostró mayor promedio ($p = 0.143$) (Tabla 3) (Figura 3).
- **TIMO.** El menor peso promedio del timo se registró en el grupo IS – EM que fue significativo con respecto a los demás grupos experimentales ($p < 0.05$). No hubo diferencia entre los promedios de los grupos EM y Sin EM, ni entre los grupos IS – Sin EM y Sin EM, aunque los del grupo Sin EM pesaron más que IS – Sin EM ($p = 0.461$) (Tabla 3) (Figura 4).
- **HÍGADO.** En los ratones inmunosuprimidos IS – EM e IS – Sin EM el peso fue superior ($p < 0.05$) al presentado por los ratones no inmunosuprimidos y C (Tabla 4).
- **TESTÍCULOS.** El mayor peso promedio (GMT) se encontró en el grupo EM pero solo fue significativo al compararlo con los grupos Sin EM y C ($p < 0.05$) (Tabla 4).
- **VESÍCULAS SEMINALES.** En los ratones de los grupos EM y Sin EM el peso fue superior ($p < 0.05$) al presentado por los ratones inmunosuprimidos y el grupo C (Tabla 4).

c) Celularidad

- **BAZO.** No hubo diferencia entre los promedios celulares de los grupos IS – EM e IS – Sin EM, aunque el grupo IS – Sin EM mostró mayor promedio ($p = 0.183$); tampoco se halló diferencia entre los promedios de los grupos EM y Sin EM. Sin embargo el grupo EM mostró mayor carga celular que el grupo IS – EM ($p = 0.033$). No se encontró diferencia de promedios entre los grupos IS – Sin EM, Sin EM y C ($p > 0.05$) (Tabla 5).

- **TIMO.** El mayor promedio se presentó en los grupos no inmunosuprimidos, solo fue significativa la diferencia entre los promedios de los grupos Sin EM e IS – EM ($p=0.0001$). No se encontró diferencia de promedios entre los grupos IS – Sin EM, Sin EM y C, aunque el grupo IS – Sin EM mostró menor promedio ($p>0.05$) (Tabla 5).
- **MÉDULA ÓSEA.** Los promedios celulares entre los grupos IS – EM e IS – Sin EM no fueron estadísticamente significativos ($p=0.088$) aunque el grupo IS – EM mostró mayor promedio; tampoco se halló diferencia significativa entre los promedios de los grupos EM y Sin EM ($p=0.246$), ni entre IS – EM y EM ($p=0.248$). El grupo C presentó el menor promedio que fue significativa al compararlo con los ratones no inmunosuprimidos e IS - EM ($p<0.05$) (Tabla 5) (Figura 7).

d) Hemograma

Los ratones tratados con el extracto metanólico (EM) mostraron mayores promedios (GMT) que los no tratados con el EM y Control en los recuentos de leucocitos, eritrocitos, plaquetas y niveles de hemoglobina ($p<0.05$) (Figura 6 y 8). Los ratones inmunosuprimidos y tratados con el EM (Grupo IS – EM) mostraron mayor porcentaje de linfocitos y células mixtas (monocitos, eosinófilos y basófilos) que los demás grupos experimentales. No se encontró diferencia significativa del porcentaje de reticulocitos (eritrocitos jóvenes con residuos de ARN) entre los cuatro grupos inmunizados con GRC, aunque los ratones tratados con el extracto metanólico (Grupo IS – EM y EM) mostraron los mayores promedios (Figura 7). No hubo diferencia significativa de los parámetros evaluados entre los grupos IS – EM y EM; tampoco entre los grupos IS – Sin EM y Sin EM, excepto el recuento de plaquetas donde el grupo IS - Sin EM mostró el menor promedio ($p=0.007$) (Tabla 6 y 7).

e) Producción de Anticuerpos anti – Glóbulos rojos de Carnero (GRC)

La inmunosupresión provocó un descenso del título de anticuerpos frente a los glóbulos rojos de carnero (GRC); en los ratones no inmunosuprimidos EM y Sin EM

los niveles de anticuerpos hemaglutinantes fueron superiores ($p < 0.05$) al presentado por los ratones IS – EM e IS – Sin EM. Los títulos de anticuerpos hemaglutinantes (IgM) entre los grupos IS – EM e IS – Sin EM no fueron significativos ($p = 0.258$), aunque el grupo IS – EM mostró mayor promedio. Los títulos determinados por los ratones del grupo C fueron nulos (Tabla 8).

Los niveles de anticuerpos hemolíticos (IgM e IgG) determinados por el grupo IS – EM fueron superiores ($p = 0.009$) al de los ratones IS – Sin EM. No se encontró diferencia entre los promedios de los niveles de anticuerpos hemolíticos de los grupos EM y Sin EM, pero ambos fueron superiores al presentado por los ratones IS – EM, solo fue significativa la diferencia entre los grupos Sin EM e IS – EM. En el grupo C la producción de anticuerpos hemolíticos fue nula (Tabla 8) (Figura 9).

f) Pérdida / ganancia de peso corporal

Al comparar el día 0 con el día 20 de tratamiento, los ratones del grupo IS – EM registraron una significativa pérdida de peso corporal. El grupo EM registró una significativa ganancia de peso corporal ($p = 0.013$). No se registró pérdida / ganancia de peso en los ratones del grupo IS – Sin EM y Sin EM (Figura 10).

2. Ecotipo Morado

a) Efecto de la dosis del Extracto metanólico sobre el comportamiento de los ratones

Los animales de los grupos EM y Sin EM se mostraron muy activos, aunque los del grupo Sin EM mostraron mayor dinamismo. La inmunosupresión provocó cambios de conducta, los ratones se mantuvieron quietos y con poca actividad, no se pudo observar diferencia de conductas entre ambos grupos.

b) Peso relativo de Órganos

- **BAZO.** El mayor peso promedio (GMT) del bazo se encontró en el grupo IS – EM y fue superior ($p < 0.05$) al de los grupos IS – Sin EM, no inmunosuprimidos y control. Los pesos promedios del bazo entre los grupos EM y Sin EM no fueron estadísticamente significativos (Tabla 3) (Figura 3).
- **TIMO.** El mayor peso promedio (GMT) se encontró en el grupo IS – EM y fue significativo ($p < 0.05$) con respecto a los demás grupos experimentales. No hubo diferencia entre los promedios de los grupos EM y Sin EM, ni entre los grupos IS – Sin EM y Sin EM (Tabla 3) (Figura 4).
- **HÍGADO.** Los ratones del grupo IS – EM mostraron el mayor peso promedio que fue significativo ($p < 0.05$) con respecto a los demás grupos experimentales. No se encontró diferencia entre los promedios de los grupos EM y Sin EM. Los ratones del grupo IS – Sin EM presentaron mayor peso promedio con respecto al grupo Sin EM ($p < 0.05$) (Tabla 4)
- **TESTÍCULOS.** El grupo IS – EM presentó el menor peso promedio que fue significativo con respecto al de los grupos IS – Sin EM y no inmunosuprimidos ($p < 0.05$). No se encontró diferencia de peso entre los grupos EM y Sin EM ($p = 0.073$) aunque el grupo EM mostró mayor promedio (Tabla 4).
- **VESÍCULAS SEMINALES.** El peso promedio del grupo IS – EM fue significativamente superior al del grupo IS – Sin EM ($p = 0.011$). Los ratones no inmunosuprimidos EM y Sin EM tuvieron mayores pesos promedios que los grupos IS – EM e IS – Sin EM ($p < 0.05$) (Tabla 4).

c) Celularidad

- **BAZO.** El mayor promedio de células del bazo se encontró en el grupo IS – EM y fue significativamente superior al de los demás grupos experimentales ($p < 0.05$) (Tabla 5).

- **TIMO.** El grupo IS – EM mostró el mayor promedio celular del timo que fue significativamente superior al de los demás grupos experimentales ($p < 0.05$). El promedio celular del grupo EM fue superior al grupo Sin EM ($p = 0.091$), con relación al del grupo IS – Sin EM el promedio fue significativamente superior ($p = 0.035$) (Tabla 5).
- **MÉDULA ÓSEA.** Los ratones no inmunosuprimidos mostraron los mayores promedios con respecto al de los grupos inmunosuprimidos, pero solo fue significativo al comparar el grupo EM con los grupos IS – EM e IS – Sin EM ($p = 0.009$ y 0.039 respectivamente) (Tabla 5) (Figura 5).

d) Hemograma

El mayor promedio de recuento de leucocitos se presentó en el grupo IS – EM que fue significativamente superior al de los ratones no tratados con el EM y Control ($p < 0.05$). No hubo diferencia entre los promedios de los grupos EM y Sin EM, aunque el grupo EM mostró mayor promedio ($p = 0.111$) y con un mayor porcentaje de linfocitos (92.4% frente a 80.94%) (Tabla 6) (Figura 6).

En cuanto al porcentaje de reticulocitos, los ratones tratados con el extracto metanólico (EM) tuvieron mayores promedios que los no tratados con el extracto ($p < 0.05$) (Figura 7). El grupo EM mostró los mayores promedios de eritrocitos, hemoglobina y plaquetas que fue significativamente superior al de los demás grupos experimentales ($p < 0.05$). Sin embargo, los menores promedios de los mismos se presentó en el grupo IS – EM, solo fue significativo al compararlo con el grupo EM ($p < 0.05$) (Tabla 7) (Figura 8).

e) Producción de Anticuerpos anti – Glóbulos rojos de Carnero (GRC)

Los niveles de anticuerpos hemaglutinantes en los ratones no inmunosuprimidos EM y Sin EM fueron significativamente superiores al de los grupos IS – EM e IS - Sin EM. No hubo diferencia significativa entre los promedios de los grupos IS – EM e IS –

Sin EM ($p=0.693$). Los títulos determinados por los ratones del grupo C fueron nulos (Tabla 8).

Los grupos no inmunosuprimidos EM y Sin EM mostraron los mayores niveles de anticuerpos hemolíticos (IgG e IgM) ($p<0.05$) con respecto al de los inmunosuprimidos. Al comparar los títulos de anticuerpos hemolíticos entre los grupos IS – EM e IS – Sin EM, el grupo IS – EM fue significativamente superior ($p=0.045$) (Tabla 8) (Figura 9).

f) Pérdida / ganancia de peso corporal

Los ratones tratados con el extracto metanólico experimentaron una ganancia del peso corporal, pero solo fue significativo lo registrado por el grupo IS – EM. No se registró pérdida / ganancia significativo del peso corporal en los grupos no tratados con el Extracto metanólico (Figura 10).

3. Ecotipo Rojo

a) Efecto de la dosis del Extracto metanólico sobre el comportamiento de los ratones

Los animales de los grupos EM y Sin EM se mostraron muy activos. Los ratones tratados con el EM mostraron mayor dinamismo, trepaban por el techo de las jaulas y corrían por todas partes como buscando alguna cosa. La inmunosupresión provocó cambios de conducta en el grupo IS – Sin EM, sin embargo los tratados con el EM continuaron muy activos.

b) Peso relativo de Órganos

- **BAZO.** Aunque el promedio del grupo EM fue ligeramente superior al del grupo Sin EM ($p=0.053$), no hubo diferencia significativa entre los cinco grupos experimentales (Tabla 3) (Figura 3).

- **TIMO.** Aunque el peso (GMT) del timo de los IS – EM fue menor, no hubo diferencia significativa con respecto a los demás grupos experimentales (Tabla 3) (Figura 4).
- **HÍGADO.** El mayor promedio se presentó en los ratones del grupo IS – Sin EM, pero solo fue significativo al compararlo con el grupo IS – EM y Sin EM ($p < 0.05$). No hubo diferencia entre los promedios de los grupos EM y Sin EM (Tabla 4).
- **TESTÍCULOS.** Los ratones tratados con EM tuvieron mayores promedios que los demás grupos experimentales, pero solo fue significativo al compararlos con el grupo C ($p < 0.05$). No hubo diferencia entre los promedios de los grupos IS - Sin EM y Sin EM (Tabla 4).
- **VESÍCULAS SEMINALES.** El peso promedio del grupo Sin EM fue mayor ($p = 0.004$) que el del grupo EM, sin embargo ambos fueron significativamente superiores ($p < 0.05$) al presentado por los ratones IS – EM e IS – Sin EM. No hubo diferencia entre los promedios de los grupos IS - EM e IS - Sin EM, aunque el grupo IS – Sin EM mostró mayor promedio ($p = 0.09$) (Tabla 4).

c) Celularidad

- **BAZO.** No se encontró diferencias de promedios celulares entre los cinco grupos experimentales, aunque el promedio del grupo EM fue ligeramente superior al presentado por los ratones del grupo IS – Sin EM ($p = 0.087$) (Tabla 5).
- **TIMO.** El menor promedio celular del timo se encontró en los ratones del grupo IS – EM que fue significativo con respecto al de los grupos no inmunosuprimidos y control ($p < 0.05$) (Tabla 5).
- **MÉDULA ÓSEA.** Aunque los ratones inmunosuprimidos IS – EM e IS – Sin EM mostraron los menores promedios celulares, estos no fueron significativos con respecto al de los grupos EM y Sin EM ($p > 0.05$) (Tabla 5) (Figura 5).

d) Hemograma

El mayor promedio de leucocitos se encontró en el grupo EM, pero solo fue significativo al compararlo con el grupo IS – Sin EM ($p=0.027$). No hubo diferencia entre los promedios de leucocitos de los grupos IS - EM e IS - Sin EM, aunque el grupo IS – EM mostró mayor promedio ($p=0.38$) y además, registró un mayor porcentaje de células mixtas (Tabla 6) (Figura 6). El grupo EM mostró mayor promedio de porcentaje de reticulocitos que los demás grupos experimentales ($p<0.05$) (Figura 7). Los mayores promedios de eritrocitos, hemoglobina y plaquetas se presentaron en el grupo IS – EM, pero solo fueron significativos con respecto al de los ratones no tratados con el EM y Control ($p<0.05$). No hubo diferencia entre los promedios de eritrocitos y hemoglobina de los grupos EM y Sin EM, aunque el grupo EM mostró mayor promedio (Tabla 7) (Figura 8).

e) Producción de Anticuerpos anti – Glóbulos rojos de Carnero (GRC)

En los ratones no inmunosuprimidos EM y Sin EM los niveles de anticuerpos hemaglutinantes fueron superiores ($p<0.05$) al presentado por los grupos inmunosuprimidos. No hubo diferencia entre los promedios de los grupos IS – EM e IS – Sin EM (Tabla 8).

Los ratones de los grupos EM y Sin EM mostraron los mayores promedios de anticuerpos hemolíticos que los ratones inmunosuprimidos IS – EM e IS – Sin EM, y entre estos últimos, el promedio del grupo IS – EM fue significativamente superior ($p=0.006$) al presentado por el grupo IS – Sin EM (Tabla 8) (Figura 9).

f) Efecto de la dosis del Extracto metanólico sobre la pérdida / ganancia de peso corporal

Los ratones tratados con el extracto metanólico experimentaron una pérdida del peso corporal, pero solo fue significativo lo registrado por el grupo IS – EM. No se registró pérdida / ganancia significativo del peso corporal en los grupos no tratados con el Extracto metanólico (Figura 10).

4. Ecotipo Negro

a) Efecto de la dosis del Extracto metanólico sobre el comportamiento de los ratones

Los animales de los grupos EM y Sin EM se mostraron muy activos, los ratones tratados con el EM mostraron mayor dinamismo. La inmunosupresión provocó cambios de conducta, los ratones se mantuvieron quietos y con poca actividad, no se pudo observar diferencia de conductas entre ambos grupos.

b) Peso relativo de Órganos

- **BAZO.** Aunque el promedio del grupo IS - EM fue ligeramente superior al del grupo EM ($p=0.36$), no hubo diferencia significativa entre los cinco grupos experimentales (Tabla 3) (Figura 3).
- **TIMO.** Aunque el peso del timo de los ratones del grupo EM fue el menor, no hubo diferencia significativa con respecto a los demás grupos (Tabla 3) (Figura 4).
- **HÍGADO.** El mayor promedio se presentó en los grupos inmunosuprimidos IS – EM e IS – Sin EM que fue superior al presentado por el grupo EM y Sin EM. No hubo diferencia entre los promedios de los grupos EM y Sin EM (Tabla 4).
- **TESTÍCULOS.** El mayor peso promedio (GMT) se encontró en el grupo EM que fue significativamente superior al de los grupos IS – EM, Sin EM y C ($p<0.05$) (Tabla 4).
- **VESÍCULAS SEMINALES.** En los ratones no inmunosuprimidos EM y Sin EM, el peso promedio fue significativamente superior ($p<0.05$) al presentado por los ratones IS – EM, IS – Sin EM y C (Tabla 4).

c) Celularidad

- **BAZO.** No hubo diferencia entre los cinco grupos experimentales (Tabla 5).
- **TIMO.** El mayor promedio celular se presentó en el grupo Sin EM que fue significativamente superior al de los ratones tratados con EM ($p<0.05$) (Tabla 5).
- **MÉDULA ÓSEA.** Aunque el promedio celular de los EM fue menor, no hubo diferencia significativa con respecto a los demás grupos experimentales (Tabla 5) (Figura 5).

d) Hemograma

El mayor promedio de leucocitos se encontró en el grupo EM y fue superior ($p < 0.05$) al de los demás grupos experimentales. Sin embargo el grupo IS – EM registró el menor promedio de recuento de leucocitos (Tabla 6) (Figura 6). No hubo diferencias significativas del promedio de reticulocitos entre los cuatro grupos experimentales (Figura 7). El recuento de eritrocitos y niveles de hemoglobina del grupo EM fue ligeramente superior respecto al grupo Sin EM ($p = 0.064$) y significativamente superior al de los grupos IS – EM e IS - Sin EM ($p < 0.05$). El grupo EM mostró los mayores recuentos de plaquetas que fueron superiores ($p < 0.05$) al de los grupos IS – Sin EM, Sin EM y C (Tabla 7) (Figura 8).

e) Producción de Anticuerpos anti – Glóbulos rojos de Carnero (GRC)

En los ratones no inmunosuprimidos, los niveles de anticuerpos hemaglutinantes (IgM) fueron superiores ($p < 0.05$) al presentado por los grupos IS – EM e IS – Sin EM. Además los del grupo IS – Sin EM fueron superiores a los ratones del grupo IS – EM ($p = 0.035$). En el grupo C la producción de anticuerpos hemaglutinantes fue nula (Tabla 8).

Los mayores niveles de anticuerpos hemolíticos se presentaron en los ratones del grupo EM, que fueron significativos con respecto a los demás grupos experimentales ($p < 0.05$). Los ratones inmunosuprimidos mostraron los menores promedios. No se encontró diferencias de promedios entre los grupos IS – EM e IS – Sin EM. En el grupo C la producción de anticuerpos hemolíticos fue nula (Tabla 8) (Figura 9).

f) Pérdida / ganancia de peso corporal

Los ratones tratados con el extracto metanólico experimentaron una pérdida del peso corporal, pero solo fue significativo lo registrado por el grupo EM. No se registró pérdida / ganancia significativo del peso corporal en los grupos no tratados con el Extracto metanólico (Figura 10).

1. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE MACA SOBRE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR.

La inoculación de caldo tioglicolato indujo un incremento en la población de macrófagos peritoneales, el medio actúa como un estímulo inflamatorio no específico (McCarron *et al.*, 1984). Las concentraciones producidas de nitrito fueron de 7.45, 6.79, 5.76, 5.61 y 6.81 mM para los EM de los ecotipos morado, negro, blanco, rojo y control respectivamente.

El EM de cada ecotipo indujo la producción de óxido nítrico, aunque las diferencias entre los tratamientos no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Aunque al compararse con el control se observó un ligero incremento con el EM del ecotipo morado y disminución con el EM del ecotipo rojo. También se observó producción de óxido nítrico en el control (sin EM) debido al uso de caldo tioglicolato como atrayente que permite concentrar una mayor cantidad de macrófagos (agente inflamatorio inespecífico) (Figura 11).

DISCUSIÓN

Los flavonoides son compuestos fenólicos con demostrada acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (Martinez – Flores *et al.*, 2002). El extracto metanólico (EM) ecotipo morado y blanco contienen las mayores concentraciones de flavonoides (2.20 Y 2.17 mg/100g EM respectivamente). El EM ecotipo rojo registró mayor cantidad de flavonoides que el ecotipo negro (1.53 frente a 0.88 mg/100g EM), esto concuerda con lo reportado por Yllesca M. (1994). Respecto a la concentración de calcio, el EM ecotipo morado registró los mejores resultados. El calcio participa en la formación de huesos y dientes, como mensajero y mediador celular, en la contracción celular, en la producción de energía, mantenimiento de la inmunidad natural y coagulación de la sangre (Weaver y Heaney, 2005). Es probable que el consumo de este ecotipo presente un efecto favorable en el tratamiento de la osteoporosis. Se determinó la concentración de hierro en cada uno de los extractos y se encontró que el EM ecotipo blanco, morado y rojo contiene los mayores valores de este mineral, favoreciendo principalmente la estimulación hematopoyética de la médula ósea (Reynoso – Gómez *et al.*, 2002) (Tabla 2A y B). La cantidad de cenizas recolectada del EM ecotipo negro después de la incineración, fue menor que los demás ecotipos. Solo se determinó el calcio y hierro presente en el extracto metanólico, no en la harina de maca, esto explica las diferencias de concentraciones con lo obtenido por Yllesca M. (1994) quién reportó que la harina de maca ecotipo negro mostraba los mayores valores de calcio y hierro que el ecotipo rojo y amarillo.

La ciclofosfamida (CF) es un agente alquilante derivado de la mostaza nitrogenada que ha sido usada ampliamente como agente antineoplásico en el tratamiento del cáncer y como inmunosupresor en las enfermedades autoinmunes. Esta droga es metabolizada principalmente en el hígado por las enzimas del citocromo P450 para formar potentes sustancias alquilantes, responsables de su acción citotóxica, y gran parte de su efecto se debe a la inhibición de la replicación del DNA (Gurtoo *et al.*, 1981). Sin embargo, la ciclofosfamida no tiene acción clono – específica, esta

inespecificidad trae como consecuencia que se vean también suprimidas respuestas beneficiosas contra los agentes infecciosos (Pearson *et al.*, 1976).

La dosis empleada de ciclofosfamida (CF) para inducir una inmunosupresión varía de un trabajo a otro. De la Paz *et al.* (1997) emplearon 200 mg/kg de CF en dosis única para inducir mielosupresión (disminución de células precursoras de los elementos sanguíneos) en ratones. Ellos evaluaron la celularidad de la médula ósea y el recuento de los elementos sanguíneos. Gokhale *et al.* (2003) emplearon CF en tres dosis diarias de 30 mg/kg de peso corporal, para inducir mielosupresión experimental. Además, estos mismos autores emplearon en otro grupo de ratones, la dosis única de CF de 50 mg/kg de peso corporal para inducir una supresión de la respuesta humoral. Todos ellos suministrado por vía intraperitoneal, dos días antes de finalizar el tratamiento.

La dosis de CF empleada en el presente estudio fue 50 mg/kg de peso corporal, pero el tiempo de tratamiento fue de 6 días más prolongado, es decir los resultados se evaluaron 8 días después de la inmunosupresión con CF (Tabla 1). Como el tiempo de tratamiento fue más prolongado, esto fue determinante para la recuperación del sistema inmune de manera natural. Esto explica los promedios similares de peso y celularidad de los órganos linfoides al comparar el grupo IS –Sin EM con el grupo Sin EM. La mielosupresión tampoco fue detectable (determinado por celularidad de la médula ósea), en el recuento de los elementos sanguíneos sólo el número de plaquetas se mantuvo disminuida hasta el día de la evaluación (Tabla 6 y 7). De la Paz *et al.* (1997) emplearon CF en la dosis única de 200 mg/kg para inducir mielosupresión en ratones y evaluaron los resultados 2, 4, 7, 9 y 14 días después de la administración de la droga. Ellos observaron que la neutropenia es más pronunciada hasta el cuarto día, tiempo después, los valores de recuentos de leucocitos y celularidad de la médula ósea tienden a igualarse al control. A pesar de eso, se observó que la producción de anticuerpos fue afectada en los ratones del grupo IS – Sin EM demostrándose su acción supresora sobre la respuesta inmune humoral (Tabla 8). Stevenson y Fauci (1980) reportaron que los linfocitos B son más sensibles que los linfocitos T a la acción de la CF, ya que esta droga es capaz de suprimir la formación de placas hemolíticas cuando se añade en una

suspensión de células B formadoras de placas; sugieren que la CF actúa bloqueando la expresión de las inmunoglobulinas de membrana de estas células.

Los ratones inmunosuprimidos con CF (Grupo IS – Sin EM) mostraron un mayor peso del hígado al compararlo con el control. La CF es conocida por ser un agente hepatotóxico que daña la microcirculación hepática resultando en una hepatomegalia, es decir un aumento de su tamaño (Mc Donald *et al.*, 2003). No se observaron diferencias de pesos en los testículos; aunque es importante señalar que éste órgano también posee células germinales de alta actividad mitótica, que los convierten en blancos de las drogas alquilantes (Aguilar – Mahecha *et al.*, 2005). Sin embargo, las vesículas seminales aún mantienen un bajo peso, posiblemente porque la fuente de energía utilizada para la elaboración del líquido seminal esta siendo redistribuida a otras partes del cuerpo, ya que esta en plena etapa de recuperación.

Actualmente, se están aplicando estas drogas antineoplásicas en combinación con varios agentes detoxificantes e inmunomoduladores con el fin de reducir o eliminar sus efectos tóxicos adversos. La maca es una planta nativa peruana muy conocida por sus efectos reproductivos. Sin embargo, estudios recientes comprobaron sus propiedades antitumorales e inmunomoduladoras que la convierte en una fuerte candidata para la investigación de su actividad inmunoestimuladora en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida. Se trabajó con el extracto metanólico obtenido de cuatro ecotipos de maca, para evaluar si poseen efecto modulador del sistema inmune y determinar posibles diferencias de acción en cuanto a su actividad biológica.

Respecto a la dosis de extracto metanólico (EM) empleada, Alzamora L. (2003) administró la dosis oral de 75 mg/kg del extracto clorofórmico de maca ecotipo amarillo y obtuvo resultados favorables en la respuesta inmune humoral y celular. La dosis empleada en el presente estudio fue de 300 mg/kg de peso corporal, es decir cuatro veces mayor al utilizado por la mencionada investigadora. Cheng *et al.* (2005) emplearon el extracto de *Chrysanthemum indicum* Linné y lo administraron en dosis orales de 75 – 300 mg/kg, la respuesta respecto a la producción de anticuerpos e hipersensibilidad tipo IV fue dosis – dependiente. Bafna y Mishrash, (2005) emplearon

las dosis orales de 200 – 800 mg/kg y encontraron que el extracto contrarrestaba la mielosupresión inducida por CF de una forma dosis dependiente. Es probable que el incremento en la dosis produzca una superación del estado de inmunosupresión en menor tiempo.

En los ratones normales tratados con el EM ecotipo blanco (Grupo EM) no se registraron modificación significativa del peso y celularidad del bazo y timo. Al parecer, es importante en qué condición se encuentra el organismo para observar la verdadera acción de una planta. Los ratones del grupo IS – EM registraron una significativa disminución del peso de los órganos linfoides (bazo y timo) (Figura 3 y 4). Sin embargo, el EM ecotipo blanco favoreció la producción de todos los elementos sanguíneos: Leucocitos, eritrocitos y plaquetas, en animales normales e inmunosuprimidos. Es interesante el buen porcentaje de células mixtas, que se observó en los ratones del grupo IS – EM (Tabla 6). Las células mixtas incluyen a los monocitos, eosinófilos y basófilos. Los monocitos son los que principalmente migran a la cavidad peritoneal ante la presencia de un antígeno en esa zona. En este estudio se utilizó como antígeno a los glóbulos rojos de carnero, que fueron inoculados intraperitonealmente. En esta zona, los monocitos se diferencian en macrófagos peritoneales, que son las células presentadoras de antígenos (APC). Un mayor número de estas APC conllevarían una rápida fagocitosis y una eficiente presentación del antígeno, que por último induce una rápida proliferación y diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos. El reducido peso del timo en los ratones del grupo IS – EM podría ser explicado a una menor exigencia de este órgano frente a una eficiente función de las células de la defensa natural como los macrófagos, lo cual resulta en una eficiente presentación antigénica y favorecería la respuesta inmune humoral; evitando el incremento innecesario de folículos secundarios en el bazo, ya que estos pueden ser pocos pero más desarrollados (Alzamora L., 2003). Otro resultado interesante es el considerable título de anticuerpos hemaglutinantes (IgM) y hemolíticos (IgM e IgG) en los ratones normales e inmunosuprimidos tratados con este extracto. Los anticuerpos IgG son los que potencian el proceso fagocítico al unirse a los receptores Fc presentes en la membrana de los macrófagos que conllevaría a una eficiente presentación antigénica (Abbas *et al.*, 2002).

Los ratones inmunosuprimidos y tratados con el EM ecotipo morado (grupo IS – EM) mostraron los mayores promedios de peso y celularidad del bazo y timo (Figura 3 y 5), además, del recuento de leucocitos y plaquetas. Sin embargo, en el grupo EM se vieron favorecidos todos los parámetros sanguíneos (leucocitos, eritrocitos, hemoglobina, reticulocitos y plaquetas). Al parecer, en un organismo inmunocomprometido, el EM ecotipo morado enfoca su acción principalmente en la serie blanca, no sólo estimulando su proliferación sino también propiciando su migración hacia los órganos linfoides de destino, por lo que también tendría un efecto quimiotáctico. Esto explicaría el menor recuento de células de la médula ósea y el mayor peso y celularidad del bazo y timo, con el objetivo de reemplazar las células linfoides que se están agotando por defender al sistema inmune. Además, en el grupo IS – EM se registró un mayor porcentaje de reticulocitos (Figura 7), indicando que el EM favorece la producción de eritrocitos pero a largo plazo. El EM no favoreció la producción de anticuerpos hemaglutinantes, sin embargo los hemolíticos (IgM e IgG) si experimentaron una considerable producción y probablemente sean de la clase IgG (Figura 9). Para que ocurra la producción de anticuerpos de la clase IgG es necesario el cambio del Switch isotópico en las células B activadas. La producción de IgG en los ratones depende del interferón – γ (IFN – γ). Un trabajo anterior reportó que el EM ecotipo morado modula la producción del IFN – γ en cultivos de linfocitos humanos (Alzamora *et al.*, 2007). El IFN – γ es la principal citoquina de activación de los macrófagos, induce la diferenciación de las células TCD4 + vírgenes a la subpoblación TH1 y el cambio del Switch isotópico de IgM a IgG. Es probable que la gran población linfocitaria (88.9 %) registrada en los ratones tratados con este extracto, sean linfocitos T, no solo por la presencia del IFN – γ sino también por el gran peso del timo. Los timocitos una vez maduros, abandonan el órgano, acceden a la circulación y se localizan en los órganos linfoides periféricos para el reconocimiento del antígeno (Abbas *et al.*, 2002).

En los ratones normales e inmunosuprimidos tratados con el EM ecotipo rojo (Grupo EM e IS - EM) no se registraron modificación significativa del peso relativo del bazo y timo, y de la celularidad del bazo, timo y médula ósea. Los ratones del grupo

EM mostraron un mayor porcentaje de reticulocitos (29%), pero cuando son inmunosuprimidos, este porcentaje es igual al de los controles (19%) (Figura 7). Sin embargo, en los ratones del grupo IS – EM se observó un mayor recuento de eritrocitos y nivel de hemoglobina (Figura 8). Al parecer cuando el organismo esta inmunocomprometido, el extracto estimularía la maduración de la línea eritroide de una manera más rápida lo que explicaría el reducido porcentaje de reticulocitos, a pesar del gran recuento de eritrocitos. El buen porcentaje de células mixtas (9.72%) registrados en los ratones del grupo IS – EM (Tabla 6), indicaría que este extracto presenta una acción similar al ecotipo blanco, esto explicaría la ligera reducción del peso de los órganos linfoides por una eficiente presentación antigénica por parte de los macrófagos que favorecería la formación de células plasmáticas productoras de anticuerpos. En los ratones tratados con el extracto metanólico no se registró una significativa producción de anticuerpos hemaglutinantes; sin embargo, los hemolíticos fijadores de complemento, si experimentaron una considerable producción (Figura 9). La prueba de fijación de complemento es una técnica más sensible que la prueba de hemaglutinación, ya que detecta menores cantidades de anticuerpos (Rose y Friedman, 1980).

Los ratones normales y tratados con el EM ecotipo negro (Grupo EM) no registraron modificación significativa del peso y celularidad del bazo y timo; sin embargo, hay una significativa producción de anticuerpos hemolíticos; aunque, no ocurre así con los hemaglutinantes (Tabla 8) (Figura 9). El EM ecotipo negro no favorece al sistema inmune cuando se administra con drogas citotóxicas como la ciclofosfamida (CF). En los ratones IS – EM se observó una disminución del recuento de células sanguíneas periféricas y producción de anticuerpos (Tabla 6, 7 y 8). Varios estudios reportaron que los extractos vegetales pueden modular el metabolismo de las drogas citotóxicas, acelerando o disminuyendo la actividad de las enzimas hepáticas de activación y detoxificación. Bin – Hafeez *et al.* (2001) reportaron que el extracto acuoso de *Cassia occidentales* modula las enzimas metabolizantes de la ciclofosfamida, al disminuir el contenido enzimático del citocromo P450 (enzimas de activación) e incrementar la actividad de la Glutathion S – Transferasa (enzimas de detoxificación), reduciendo de esta manera su inmunotoxicidad. Es posible que el EM ecotipo negro actúe modulando el metabolismo de la ciclofosfamida, pero aumentando las enzimas de

activación y disminuyendo las de detoxificación, lo que explicaría los resultados observados en el grupo IS – EM. Además los ratones del grupo IS – EM registraron un mayor peso del hígado al compararlos con el grupo EM, por lo general se relaciona este incremento con una toxicidad hepática (Bin – Hafeez *et al.*, 2003) por lo que se debería estimar el nivel de las enzimas transaminasas en el suero de los ratones, ya que estas enzimas se elevan cuando las células del hígado están dañadas.

La medida de flavonoides por espectrometría mostró que el EM de los ecotipos blanco, morado y rojo presenta las mayores concentraciones de flavonoides, por lo que es probable que este metabolito participe en los resultados favorables en la respuesta inmune, observados con estos ecotipos. Varios estudios han confirmado el rol de los flavonoides en la desactivación de los radicales libres. Además, el metabolismo de la ciclofosfamida también resulta en la formación de radicales libres, que inician una cadena autocatalítica de peroxidación lipídica, lo cual resulta en la destrucción de la membrana y muerte celular (Gurtoo *et al.*, 1981). Lahouel *et al.* (2004) trataron con flavonoides durante 14 días a ratones inmunosuprimidos con CF y obtuvieron resultados favorables en los parámetros hematológicos y hepáticos confirmando el rol protector de los flavonoides contra la toxicidad de agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, no se puede descartar el papel de los isotiocianatos; ya que se ha comprobado su papel en modular las enzimas del citocromo P450, suprimiendo las enzimas de activación o induciendo a las enzimas implicadas en la detoxificación (Hecht *et al.*, 1999; Sandoval *et al.*, 2002; Pullar *et al.*, 2004).

La médula ósea es un lugar de continua proliferación y renovación de células sanguíneas, además de ser una fuente de células involucradas en la respuesta inmunológica (Sans – Sabrafen, L. 1994). Debido a su elevado grado de proliferación celular, la médula ósea se convierte en el órgano más afectado durante cualquier terapia de inmunosupresión con fármacos citotóxicos como la ciclofosfamida. Estos resultados nos indican que el EM de los ecotipos blanco, rojo y morado modulan la actividad de la médula ósea, ofreciendo protección frente a la mielosupresión inducida por ciclofosfamida. Es probable que el extracto metanólico ejerza acción similar al de las citoquinas hematopoyéticas, aumentando en la sangre periférica todas las líneas

celulares. Otro posible efecto sería su acción quimiotáctica sobre estas células promoviendo su salida más rápida a la sangre periférica (Sans – Sabrafen, L. 1994). El recuento de reticulocitos en sangre periférica es un dato útil para establecer el índice de efectividad global de la eritropoyesis, los resultados hacen pensar que el EM de los ecotipos blanco, morado y rojo tiene un efecto favorable sobre la eritropoyesis, es decir se da una respuesta reforzada de la médula sobre la producción de eritrocitos. Por otra parte estos ecotipos registraron las mayores concentraciones de hierro. El hierro es un cofactor crítico en la función inmune y su deficiencia es la principal causa de la anemia. La anemia por deficiencia de hierro se asocia a una disminución de la actividad fagocítica y niveles de inmunoglobulinas, además de alterar la respuesta de las células T y la producción de IL – 12 (Pawar *et al.*, 2006); por lo que su presencia en los ecotipos mencionados contribuiría significativamente en la estimulación de la médula ósea. Los ecotipos blanco, morado, rojo y negro (este último solo en animales no inmunosuprimidos) favorecen significativamente la producción de anticuerpos hemolíticos fijadores de complemento que son de la clase IgM e IgG. Los anticuerpos IgG potencian el proceso fagocítico al unirse a los receptores Fc presentes en la membrana de los macrófagos. 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. Bafna y Mishra (2005) estudiaron la actividad inmunomoduladora del extracto metanólico de *Cissampelos pareira* y demostraron que el extracto estimulaba la inmunidad celular al aumentar la respuesta DTH, propiciaba un incremento de la velocidad fagocítica y contrarrestaba los efectos de mielosupresión inducida por ciclofosfamida al aumentar los niveles de leucocitos, aunque no se registraron modificaciones alguna en la respuesta humoral frente a los GRC. Sin embargo los EM ecotipos morado y rojo no favorecieron la producción de anticuerpos hemaglutinantes. No necesariamente el incremento de los valores de leucocitos y de su recuento diferencial está relacionado a un incremento en la producción de anticuerpos hemaglutinantes. Perez *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.

La producción de anticuerpos de la clase IgG en los ratones depende del interferón γ (IFN γ) que modula el cambio del Switch isotópico en las células B activadas. Los estudios realizados con cultivos de linfocitos, señalan que solo el EM ecotipo morado estimula la producción del IFN γ por parte de los linfocitos T (Alzamora *et al.*, 2007). Es probable que el EM ecotipo blanco y rojo actúen directamente como agonistas del receptor del IFN γ sobre la membrana de los linfocitos B o indirectamente propiciando el incremento de macrófagos productoras de citoquinas como la IL – 12, que al final estimula la producción de IFN γ por parte de los linfocitos T. El recuento diferencial de leucocitos en los ratones tratados con el EM ecotipo blanco y rojo, señala que ambos extractos inducen el incremento de las células mixtas, que incluyen entre otros a los monocitos, células precursoras de los macrófagos.

Los ratones inmunosuprimidos y tratados con el EM (Grupo IS – EM) ecotipo blanco, registraron una significativa reducción de su peso corporal pero con un significativo incremento del peso del hígado. Esto podría ser explicado por un efecto modulador de este ecotipo sobre el eje H – P – A con la liberación de glucocorticoides, ya que estas hormonas tienen función anabólica en el hígado induciendo la síntesis de glucógeno; y una acción catabólica en las células musculares, que implica una reducción del peso corporal por la menor consistencia del tejido muscular (Villalobos, G. 2003). Otra posible explicación sería que el EM ecotipo blanco induzca una toxicidad hepática, aunque si este fuera el caso se vería también afectada la respuesta inmune, que no se observó en este estudio. Los ratones del grupo EM – IS tratados con el ecotipo morado registraron una significativa ganancia de su peso, esto acompañado con un incremento en el peso del hígado y vesículas seminales; ambos órganos acumulables de energía. Es probable que el EM ecotipo morado posea un mayor contenido de nutrientes, más que los otros ecotipos evaluados. De igual forma se podría relacionar el mayor peso corporal con el incremento de peso de sus órganos linfoides que fue la mayor registrada en comparación a los otros ecotipos. Los ratones tratados con el EM ecotipo rojo experimentaron una significativa pérdida de su peso, esto puede

ser explicado por la continua actividad locomotora de estos animales luego de la ingesta de alimentos (Alzamora, L. 2003) (Figura 10). Aunque las diferencias no son significativas, la IS afectó también el peso de las vesículas seminales en los ecotipos blanco y rojo. Las vesículas seminales son órganos andrógenos dependientes por lo que su peso depende de la acción de la hormona testosterona. El reducido peso de las vesículas estaría relacionado a una disminución de los niveles de esta hormona. Es interesante señalar que en los ratones no IS y tratados con el EM ecotipo rojo también registraron una significativa disminución del peso de las vesículas seminales, esto concuerda con lo reportado por González *et al.* (2005) por lo que no se puede descartar la presencia de glucosinolatos antagonistas del receptor andrógeno.

Respecto al cultivo de macrófagos peritoneales, se encontró que los EM a la dosis de 800 µg/ml no inducen la producción de óxido nítrico en los cultivos de macrófagos. Aunque las diferencias no son significativas, es importante señalar que a la dosis trabajada, se evidenció una mayor y menor producción de NO para los ecotipos morado y rojo, respectivamente. En el caso del ecotipo morado, Alzamora *et al.* (2007a) determinaron que este ecotipo también estimulaba una mayor producción de IFN – γ por cultivos de linfocitos humanos; por lo tanto el efecto sería de amplio espectro. Respecto al ecotipo rojo, el efecto antiinflamatorio sobre la próstata en ratas fue observado por Gonzales *et al.*, (2005) y podría estar relacionado con la menor producción de NO encontrada en el presente estudio (Figura 11). Sin embargo son necesarios más estudios, variando la concentración de la dosis y/o trabajando con macrófagos estimulados con LPS para corroborar estos resultados. La inoculación de caldo tioglicolato (CT) indujo un incremento en la población de macrófagos peritoneales, esta técnica es muy utilizada para la colección de grandes cantidades de estas células (Mc Carron et el, 1984). El caldo tioglicolato debido a su propia composición, funcionaría como un estímulo inflamatorio no específico, donde los macrófagos sonsacados con este agente, son metabólicamente y funcionalmente diferentes que los macrófagos residentes (Cohen *et al.*, 1981; Shaw *et al.*, 1982). Esto explicaría la ligera producción de óxido nítrico en los cultivos sin tratar. Sin embargo estos macrófagos-CT no son activos en varias funciones inmunológicas como los macrófagos expuestos a microorganismos (Eichner *et al.*, 1983).

Piacente *et al.* (2002) reportaron que el extracto metanólico de maca, ecotipo amarillo, contiene muchos componentes biológicamente activos: Uridina, ácido málico, glucosinolatos, isotiocianatos, aminoácidos, azúcares libres y el alcaloide β – carboline. Alzamora L. (2003) empleo el extracto clorofórmico de maca en ratones y observó que este extracto posee actividades inmunomoduladoras. Sin embargo son muchos los metabolitos a quienes se les atribuye este efecto. Algunos investigadores reportan que las saponinas, fibras y flavonoides son los responsables de este efecto (Bin –Hafeez *et al.*, 2003). También se le atribuye un efecto estimulador a los triterpenos y sesquiterpenos, ya que estos metabolitos forman complejos unidos al antígeno desencadenando la secreción de IL – 2 e IFN – γ por parte de las células (Tiwari *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

1. Los extractos metanólicos de los ecotipos blanco, morado y rojo registran las mayores concentraciones de flavonoides y hierro, mientras que el extracto metanólico ecotipo morado registra la mayor concentración de calcio.
2. El extracto metanólico del ecotipo morado produce el incremento de peso y celularidad del bazo y timo, señalando una intensa actividad inmune e induce un significativo incremento del peso corporal en los ratones tratados.
3. Los extractos metanólicos de los ecotipo blanco y rojo inducen el incremento porcentual de las células mixtas, la cual incluyen a los monocitos, células precursoras de los macrófagos; además el ecotipo rojo favorece la producción de eritrocitos en animales inmunosuprimidos con ciclofosfamida.
4. Los extractos metanólicos de los ecotipos blanco, morado y rojo modulan la actividad de la médula ósea evidenciado por el recuento favorable de células sanguíneas,
5. El extracto metanólico del ecotipo blanco favorece la producción de anticuerpos hemaglutinantes y hemolíticos.
6. Los extractos metanólicos de los ecotipos blanco, morado y rojo favorecen significativamente la producción de anticuerpos fijadores de complemento.
7. Los extractos metanólicos de los ecotipos rojo, blanco, morado y negro a la dosis de 800 µg/ml no inducen la producción de óxido nítrico en los cultivos de macrófagos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.; Lichtman, A. y Pober, J. 2002. Inmunología Celular y Molecular. *McGraw-Hill-Interamericana*. 3^{ra} edición. España.
- Aguilar – Mahecha, A.; Hales, B. y Robaire, B. 2005. Effects of acute and chronic Cyclophosphamide treatment on meiotic progression and the induction of DNA Double – Strand Breaks in Rat Spermatocytes. *Biology of reproduction*. 72: 1297 – 1304.
- Alzamora Gonzales, Libertad. 2003. Estudio del efecto antitumoral e inmunomodulador del extracto clorofórmico de raíces de *Lepidium peruvianum* G. Chacón “Maca” (Brassicaceae) en ratones. Tesis. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Alzamora, L.; Galván, P.; Rojas, N.; Cereceda, M.; Olivera, J.; Colona, E.; Alzamora, D. y Marcelo, A. 2003. Actividad moduladora del extracto alcaloidal de maca *Lepidium peruvianum* Chacón sobre la inmunidad humoral in vivo. Libro de resúmenes de la XII Reunión Científica del ICBAR.
- Alzamora, L.; Ávila, G.; Colona, E.; García, J.; Olivera, J. y Alzamora, D. 2004. Immunostimulation by aqueous extract from *Lepidium peruvianum* (Maca) on cyclophosphamide-induced suppression mice. XIII Scientific Reunion of the ICBAR. Biological Sciences Faculty, San Marcos University, Lima, Peru.
- Alzamora, L.; Marcelo, A.; Alzamora, D. y Esquivel, M. 2004. Stimulation of the immune response by alcaloidal extract from *Lepidium peruvianum* (Maca) on methylprednise-suppressed mice. XIII Scientific Reunion of the ICBAR. Biological Sciences Faculty, San Marcos University, Lima, Peru.

- Alzamora, L.; Galván, P.; Castillo, E.; Colona, E.; Woll, P. y Alzamora, D. 2004. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages, in vitro, induced by alcaloidal extract from *Lepidium peruvianum* (Maca). XIII Scientific Reunion of the ICBAR. Biological Sciences Faculty, San Marcos University, Lima, Peru.
- Alzamora, L.; Solís, H.; Rojas, M.; Calderón, M.; Colona, E.; Alvarez, E.; Quispe, J. y Torres, D. 2007. Actividad leishmanicida del extracto metanólico de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón (Brassicaceae). *Rev. peru. biol.* 13(3): 211 – 214.
- Alzamora, L.; Galván, P.; Alvarez, E.; Torres, D.; Colona, E.; Aliaga, M. y Marcelo, A. 2007. Producción de IFN- γ 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.
- Arana Courrejolles, María del Carmen. 2005. Informe sobre la Maca y el Paiche. Taller Técnico: El uso de indicaciones geográficas, denominaciones de origen o marcas colectivas para promover el biocomercio.
- Atal, C. K.; Sharma, M.L.; Kaul, A. y Khajuria, A. 1989. Immunomodulating Agents of Plant Origin. I: Preliminary Screening. *J. Ethnopharmacology* 18(2): 133 – 141.
- Bafna, A.R. y Mishra, S.H. 2005. Actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de las raíces de *Cissampelos pareira* Linn. *Ars Pharmaceutica.* 46(3): 253 – 262.
- Bin – Hafeez, B.; Ahmad. I.; Haque. R. y Raisuddin, S. 2001. Protective effect of *Cassia occidentalis* L. on cyclophosphamide - induced suppression of humoral immunity in mice. *Journal of Ethnopharmacology.* 75: 13 – 18.

- Bin – Hafeez, B.; Haque, R.; Parvez, S., Pandey, S.; Sayeed, I. y Raisuddin, S. 2003. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. *International immunopharmacology*. 3: 257 – 265.
- Bianchi, Antonio.2003. Maca *Lepidium meyenii*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. 2(3): 26 – 44.
- Bird, B y Forrester, F. 1981. Basic Laboratory Techniques in Cell Culture. *U.S. Department of Health and Human Services*.
- 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.
- Cohen, M.; Ryan, J. y Root, R. 1981. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: The relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect of monolayer formation. *Journal of Immunology* 127(3): 1007 – 1011.
- Cui, B.; Zheng, B.; He, K. y Zheng, Q. 2003. Imidazole Alkaloids from *Lepidium meyenii*. *J. Nat. Prod.*: 66: 1101-1103.
- Cheng, W.; Li, J.; You, T. y Hu, CH. 2005. Anti – inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linné. *Journal of Ethnopharmacology*. 101: 334 – 337.
- Dahanukar, S.A.; Kulkarni, R.A. y Rege, N.N. 2000. Pharmacology of Medicinal Plants and Natural Products. *Indian Journal of Pharmacology*. 32: 81 – 118.

- De la Paz, J.; Sotolongo, M.; Céspedes, A.; Curi, M.; Perdomo, M. y Miranda, R. 1997. Extracto de *Aloe Barbadensis* inyectable en la atenuación de la mielosupresión por ciclofosfamida en ratones. *Rev. Cubana Plant. Med.* 2(3): 35 – 39.
- Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P. y Schettino, O. 1994. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry.* 49: 347 – 349.
- Dini, I.; Tenore, G. C. y Dini, A. 2002. Glucosinolates from Maca (*Lepidium meyenii*). *Biochemical Systematics and Ecology.* 30: 1087 – 1090.
- Eichner, R. y Smeaton, T. 1983. Agar Accumulates in Rat Peritoneal Macrophages Elicited with Thioglycollate Broth. *Scand. J. Immunol.* 18: 259 – 263.
- Francois Bach, Jean. 1984. Inmunología. *Editorial Limusa S.A.* México.
- Gokhale, A. Dancre, A. y Saraf, M. 2003. Investigations into the immunomodulatory activity of *Argyrea speciosa*. *Journal of Ethnopharmacology.* 84: 109 – 114.
- Gonzáles G. F.; Córdova, A.; Vega, K.; Cheng, A. y Villena, A. 2003. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *Journal of endocrinology.* 176: 163 – 168.
- Gonzales, G. F.; Miranda, S.; Nieto, J.; Fernández, G.; Yucra, S.; Rubio, J.; Yi, P. y Gasco, M. 2005. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reproductive Biology and Endocrinology.* 3(1): 5 – 13.
- Gonzales, C.; Rubio, J.; Gasco, M.; Nieto, J.; Yucra, S. y Gonzales, G. F. 2006. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium*

meyenii (MACA) on spermatogenesis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 103: 448 - 454.

- Gurtoo H.; Marinello, A.; Struck, R.; Paul, B. y Dahms, R. 1981. Studies on the mechanism of denaturation of Cytochrome P – 450 by Cyclophosphamide and its metabolites. *The Journal of Biological Chemistry*. 256(22):11691 – 11701.
- Hecht, S. 1999. Chemoprevention of Cancer by Isothiocyanate, Modifiers of Carcinogen Metabolism. *J. Nutr.* 129: 768 – 774.
- Hoareau, L. y DaSilva, E. 1999. Medicinal plants: a re-emerging health aid. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*. 2(2): 56 – 81.
- Ignacio, S.; Ferreira, J.; Almeida, M. y Kubelka, C. 2001. Nitric oxide production by murine peritoneal macrophages in vitro and in vivo treated with *Phyllanthus tenellus* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 74:181 – 187.
- Lahouel, M.; Boulkour, S.; Segueni, N. y Pillastre, J. 2004. Protective effect of flavonoides against the toxicity of vinblastine, cyclophosphamide and paracetamol by inhibition of lipid – peroxydation and increase of liver glutathion. *Haema*. 7: 59 – 67.
- Lee, K.; Dabrowski, K.; Sandoval, M. y Miller, M. 2005. Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture* 244: 293 – 301.
- Lees, D.H. y Francis, F.J. 1972. Standardization of pigment analyses in cranberries. *HortScience*. 7: 83 – 84.

- Martínez – Flores, S.; Gonzáles – Gallego, J.; Culebras, J. y Tuñón, M. 2002. Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.*6: 271 – 278.
- Mc Carron, R.; Goroff, D.; Luhr, J.; Murphy, M. y Herscowitz, H. 1984. Methods for the Collection of Peritoneal and Alveolar Macrophages. *Methods in Enzimology* 108: 274 – 284.
- Mc Donald, G.; Slatlery, J.; Bouvier, M.; Ren, S.; Batchelder, A.; Kalthorn, T.; Schoch, H.; Anasetti, C. y Gooley, T. 2003. Cyclophosphamide metabolism, liver toxicity and mortality following hematopoietic Stem Cell transplantation. *BLOOD*. 101(5): 2043 – 2048.
- Muhammad, I.; Zhao, J.; Chuck, D. y Khan, I. 2002. Constituents of *Lepidium meyenii* (maca). *Phytochemistry* 59:105 – 110.
- Obregón Vilches, Lida. 1998. “Maca” Planta medicinal y nutritiva del Perú. *Instituto de Fitoterapia Americano*. 1^{era} edición. Lima –Perú.
- Pawar, R.; Jain, A.; Kashaw, S. y Singhai, A. 2006. Haematopoietic activity of *Asteracontha longifolia* on cyclophosphamide – induced bone marrow suppression.
- Pearson C.; Johnson A. y Feller I. 1976. Effect of cyclophosphamide on the immune response to *Pseudomonas aeruginosa* in Mice. *Infection and Immunity*. 14: 168 – 177.
- 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.

- Piacente, S.; Carbone, V.; Plaza, A.; Zampelli, A. y Pizza, C. 2002. Investigation of the Constituents of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *J. Agric. Food Chem.* 50: 5621 – 5625.
- Pullar, J.; Thomson, S.; King, M.; Turnbull, C.; Midwinter, R. y Hampton, M. 2004. The chemopreventive agent phenethyl isothiocyanate sensitizes cells to Fas – mediated apoptosis. *Carcinogenesis.* 25(5): 765 – 772.
- Reynoso – Gómez, E.; Salinas – Rojas, V. y Lazo – Langner. 2002. Eficacia y seguridad de la infusión total de hierro en el tratamiento de la anemia ferropriva en adultos no gestantes. *Revista de investigación clínica.* 54: 12 – 20.
- Rose, N y Friedman, H. 1980. Manual of Clinical Immunology. *American Society for Microbiology.* 2da Edition. Washington D.C.
- 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.
- Sandoval, M.; Okuhama, N., Angeles, F.; Melchor, V.; Candezo, L.; Lao, J. y Miller, M. 2002. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry* 79: 207 – 213.
- Sans – Sabrafen, J. 1994. Hematología Clínica. *Mosby Doyma Libros, S.A.* 3ra Edición. España.
- Shaw, D. y Griffin, F. 1982. Thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages are less efficient than resident macrophages in antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunology.* 128: 433 – 440.

- Stevenson, H. C. y Fauci, A. S. 1980. Differential effects of *in vitro* cyclophosphamide on human lymphocyte subpopulations involved in B – cell activation. *Immunology*. 39: 391 – 397.
- Tamez, R.; Rodriguez, C.; Tamez, P.; Weber, R.; Gómez, R. y Calderón, C. 2001. Activación de macrófagos y linfocitos *in vitro* por extractos metanólicos de hojas de *Plantago major*. *Ciencia UANL*. 4(3): 304 – 313.
- Tiwari U, Rastogi B, Singh P, Saraf DK, Vyas SP. 2004. Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Tridax procumbens* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol*; 92: 113 – 119.
- Valentová, K. y Ulrichová, J. 2003. *Smallanthus Sonchifolius* and *Lepidium meyenii*-Prospective andean crops for the prevention of chronic diseases. *Biomed. Papers* 147(2): 119 – 130.
- Valentová, K.; Buckiová, D.; Kren, V.; Peknicová, J.; Ulrichová, J. y Simánek. 2006. The *in vitro* biological activity of *Lepidium meyenii* extracts. *Cell Biol Toxicol* 22: 91-99.
- Villalobos Chaves, Gabriela. Glucocorticoides. *Centro Nacional de Información de Medicamentos*.
- Yllesca Gutierrez, María Gregoria. 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.
- Weaver C. y Heaney, R. 2005. Calcium in human health. *Human Press In*.

- Zhang, Y.; Yu, L.; Ao, M. y Jin, W. 2006. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. *Journal of ethnopharmacology* 105: 274 – 279.
- Zhao, J.; Muhammad, I.; Chuck Dunbar, D.; Mustafa, J. y Khan, I. 2005. New Akamides from Maca (*Lepidium meyenii*). *J. Agric. Food Chem.* 53: 690 – 693.

TABLAS Y FIGURAS

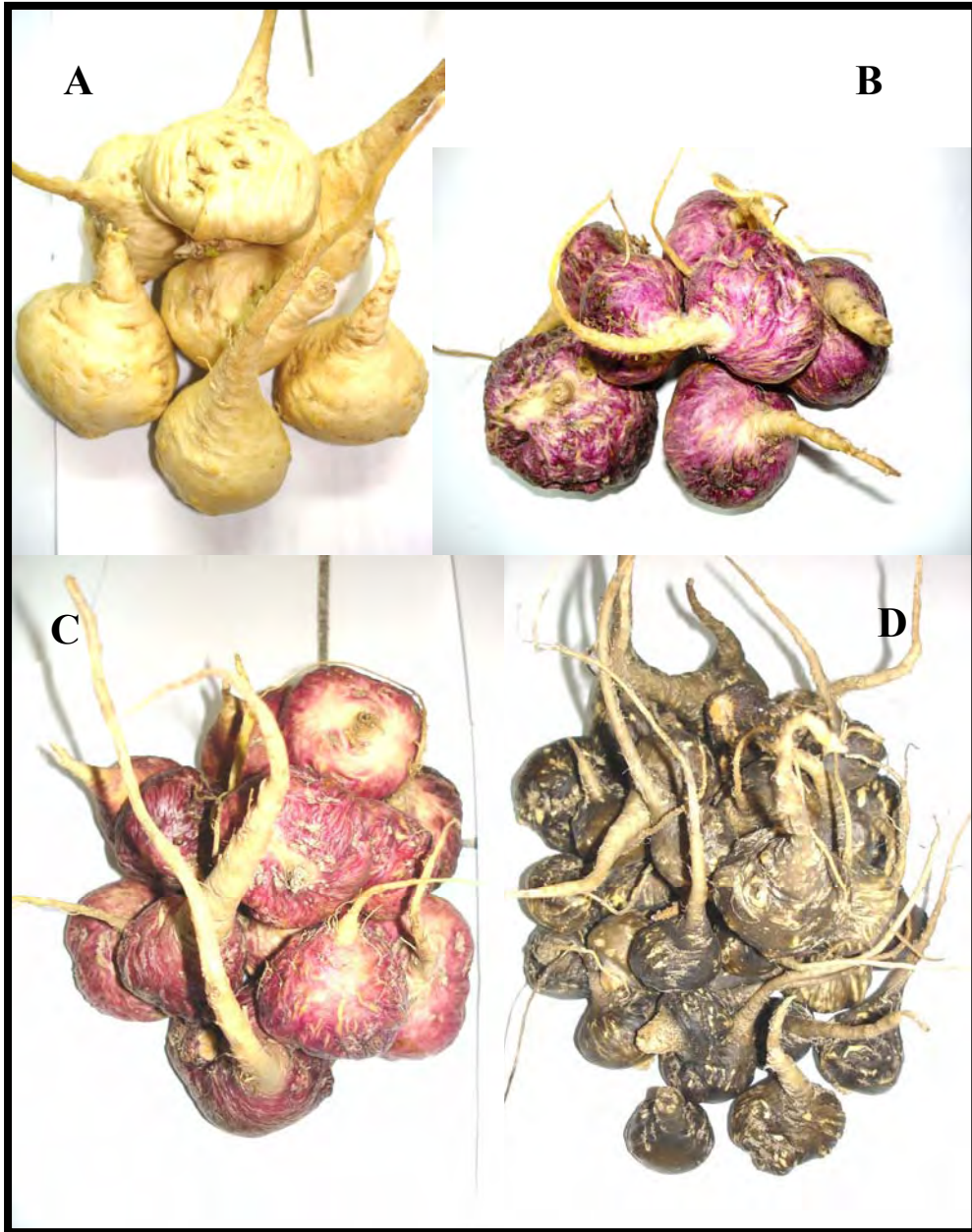


FIGURA 1. ECOTIPOS DE MACA: BLANCO (A), MORADO (B), ROJO (C) Y NEGRO (D).

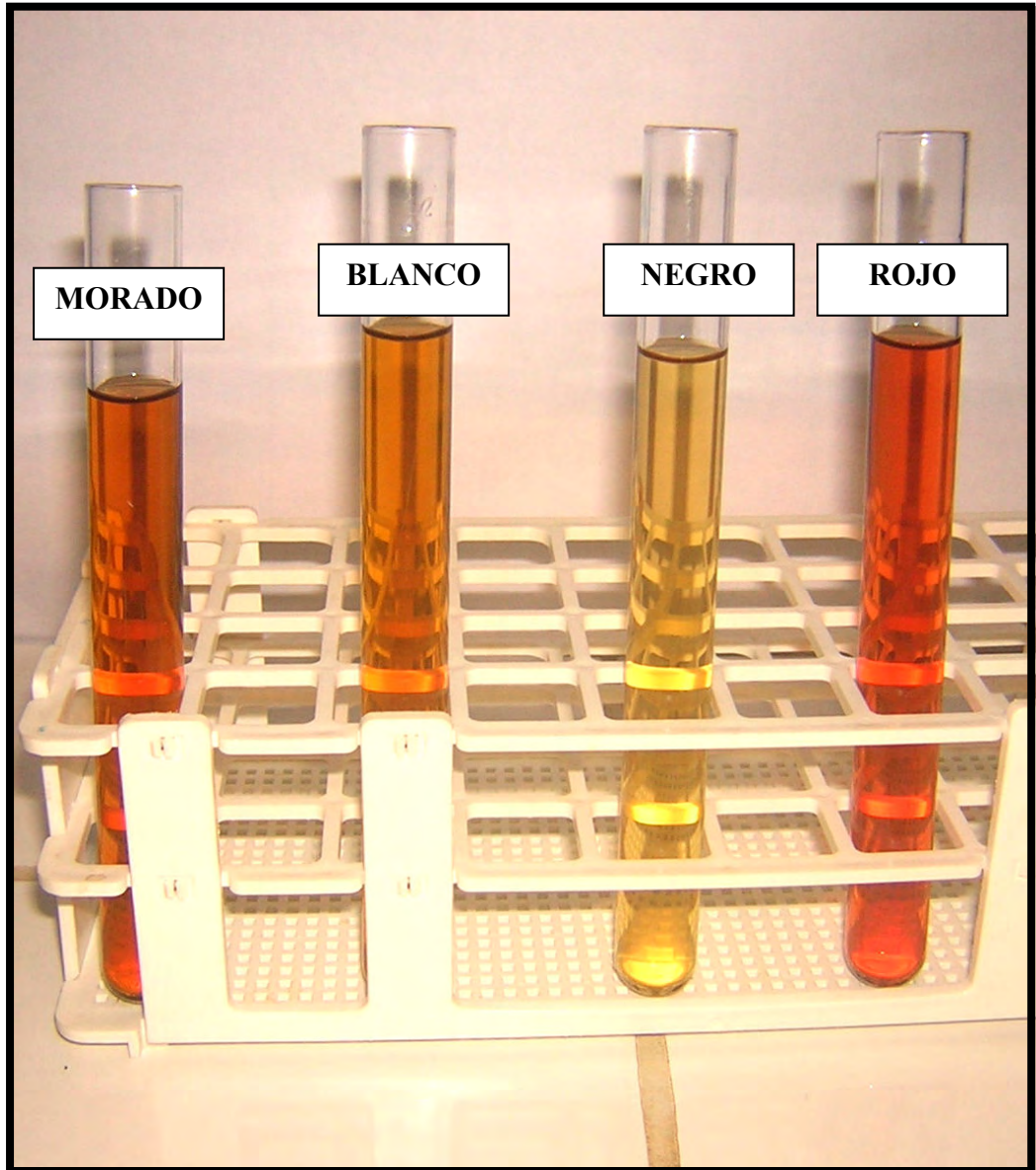


FIGURA 2. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDEOS DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LOS ECOTIPOS BLANCO, MORADO, ROJO Y NEGRO DE MACA. La foto corresponde al filtrado obtenido, después de macerar el EM con alcohol acidificado.

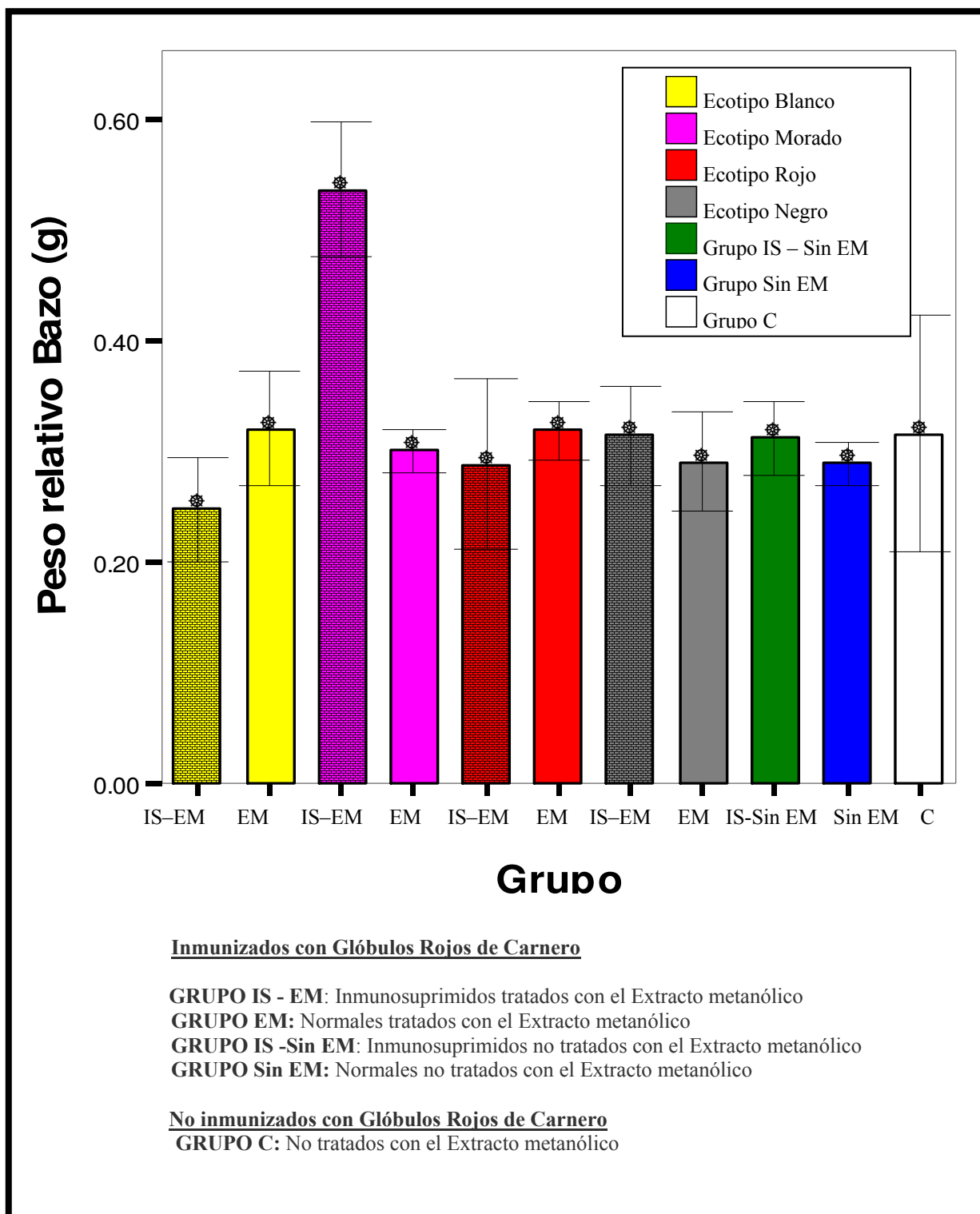


FIGURA 3. COMPARACIÓN DEL PESO RELATIVO DE BAZO. Entre ratones Swiss tratados con el extracto metanólico (IS – EM y EM) y ratones no tratados con el extracto metanólico de maca (IS – Sin EM, Sin EM y C).

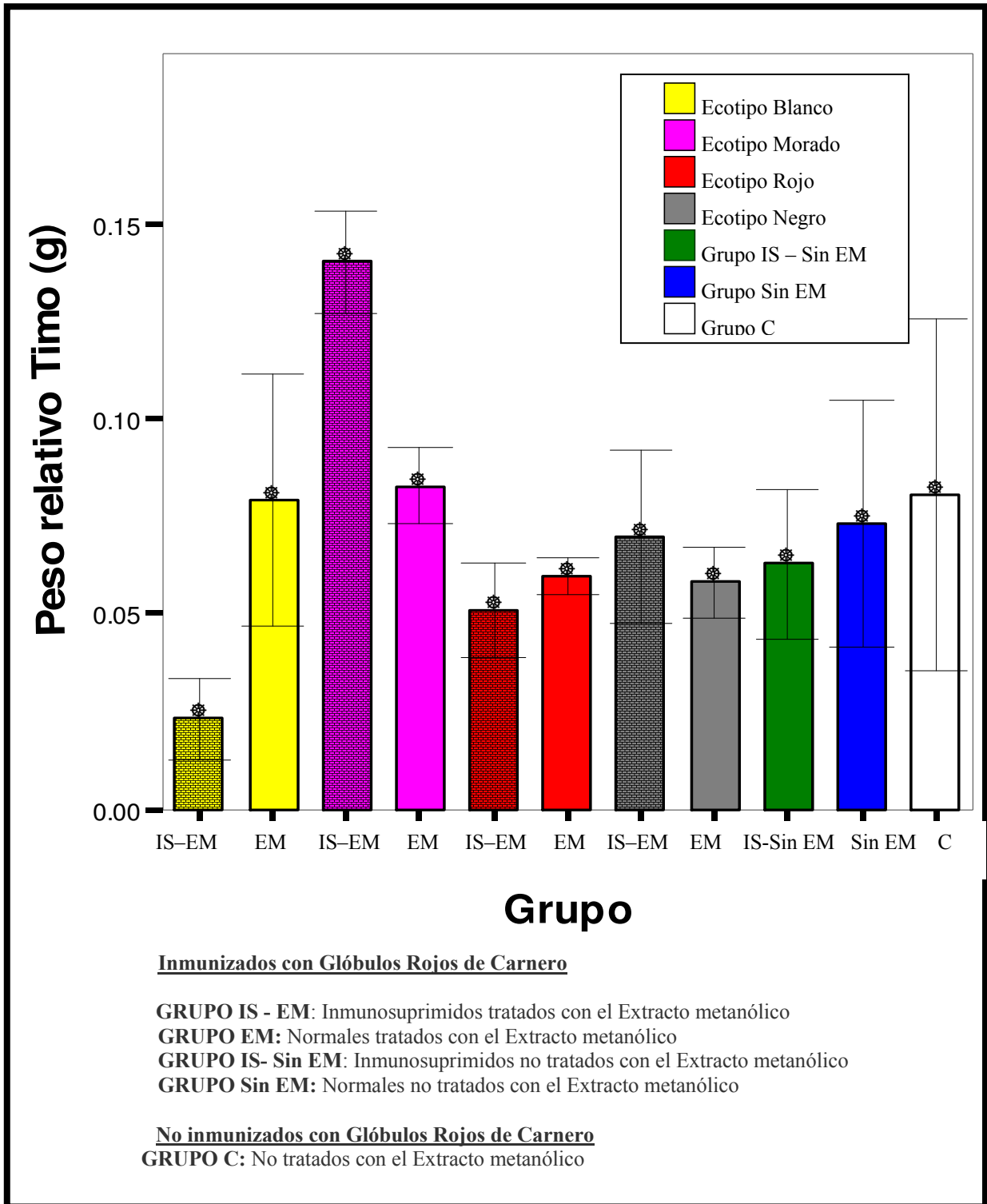


FIGURA 4. COMPARACIÓN DEL PESO RELATIVO DE TIMO. Entre ratones Swiss tratados con el extracto metanólico (IS – EM y EM) y ratones no tratados con el extracto metanólico de maca (IS – Sin EM, Sin EM y C).

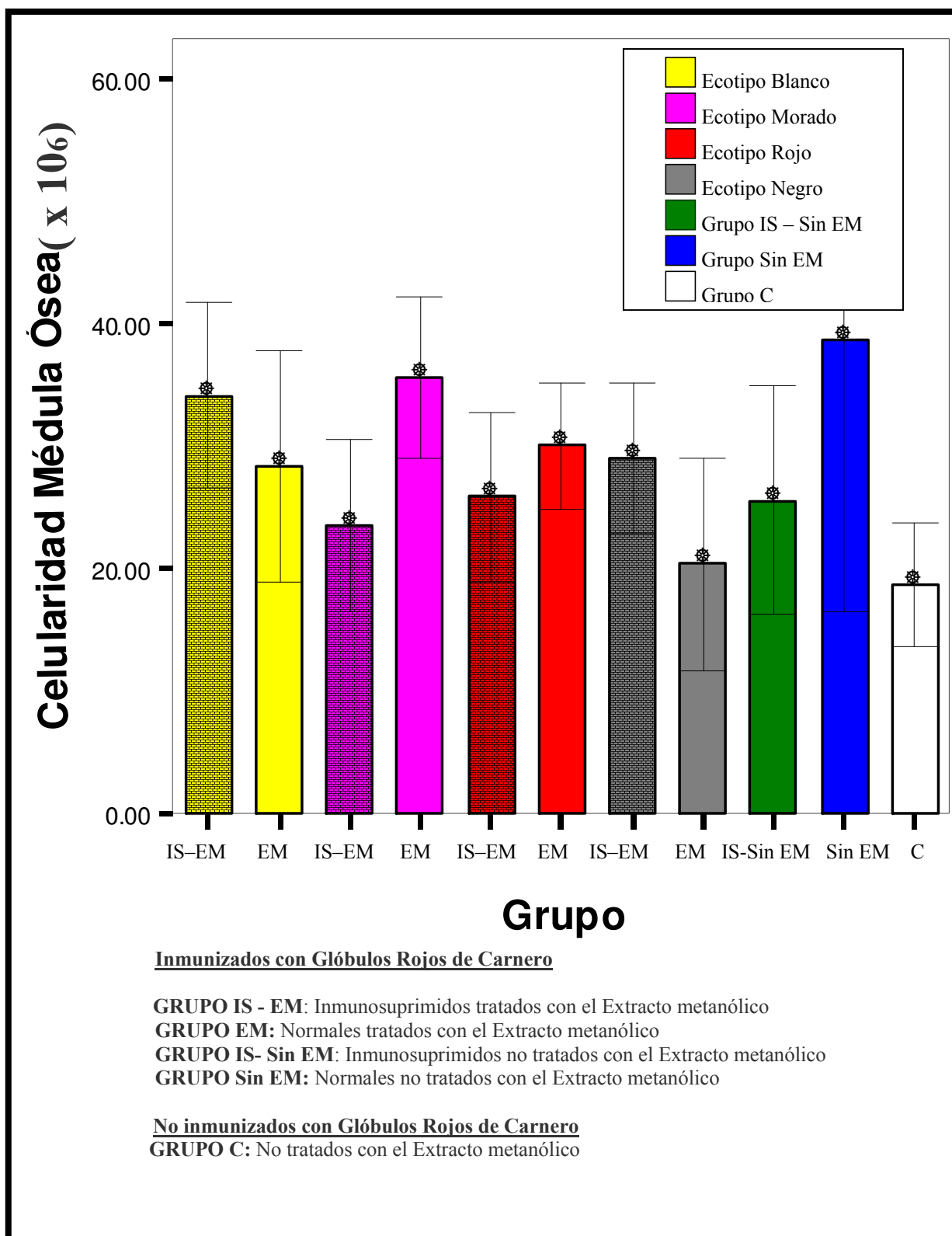


FIGURA 5. COMPARACIÓN DE LA CELULARIDAD DE LA MÉDULA ÓSEA. Entre ratones Swiss tratados con el extracto metanólico (IS – EM y EM) y ratones no tratados con el extracto metanólico de maca (IS – Sin EM, Sin EM y C).

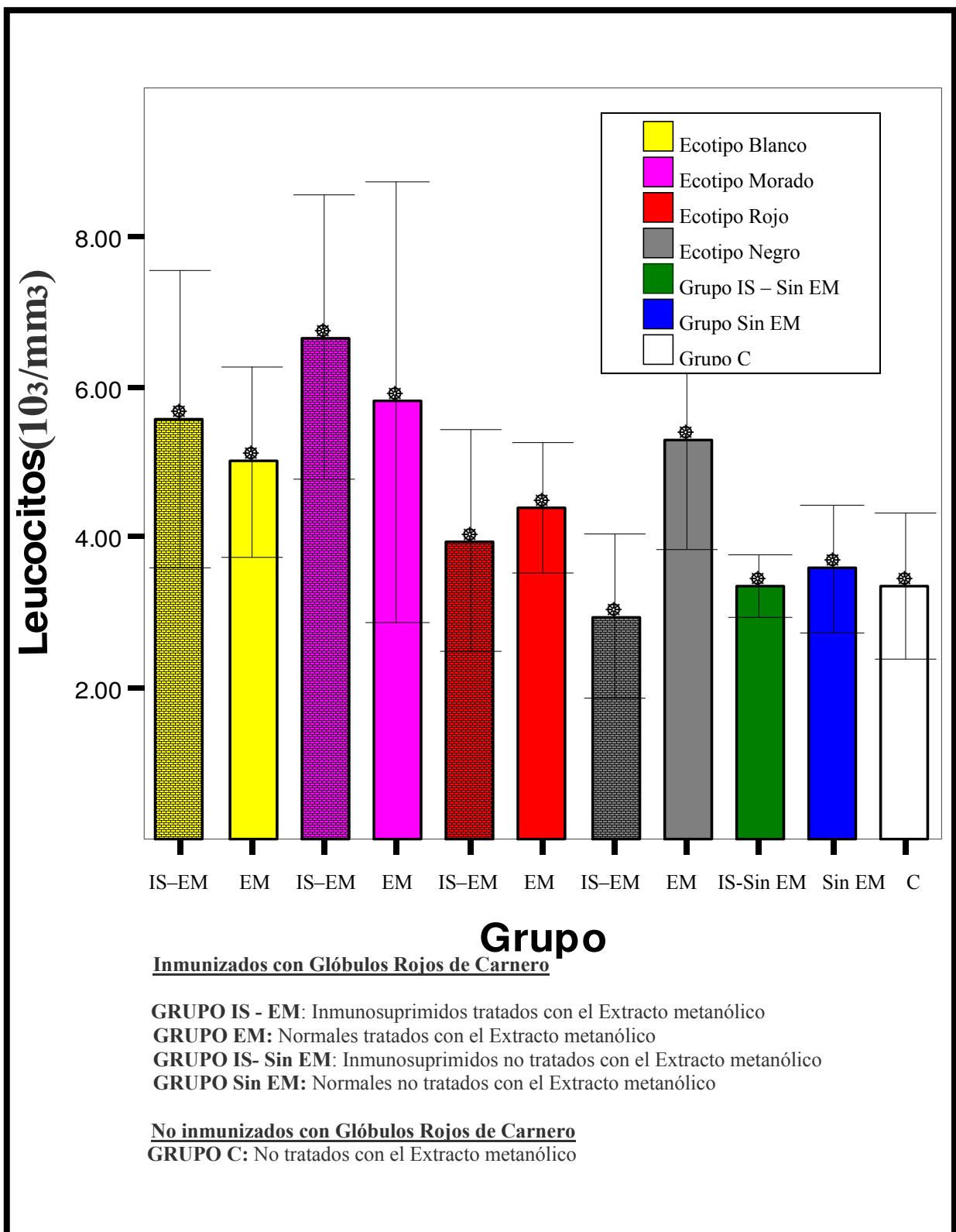


FIGURA 6. COMPARACIÓN DEL RECUENTO DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA. Entre ratones Swiss tratados con el extracto metanólico (IS – EM y EM) y ratones no tratados con el extracto metanólico de maca (IS – Sin EM, Sin EM y C).

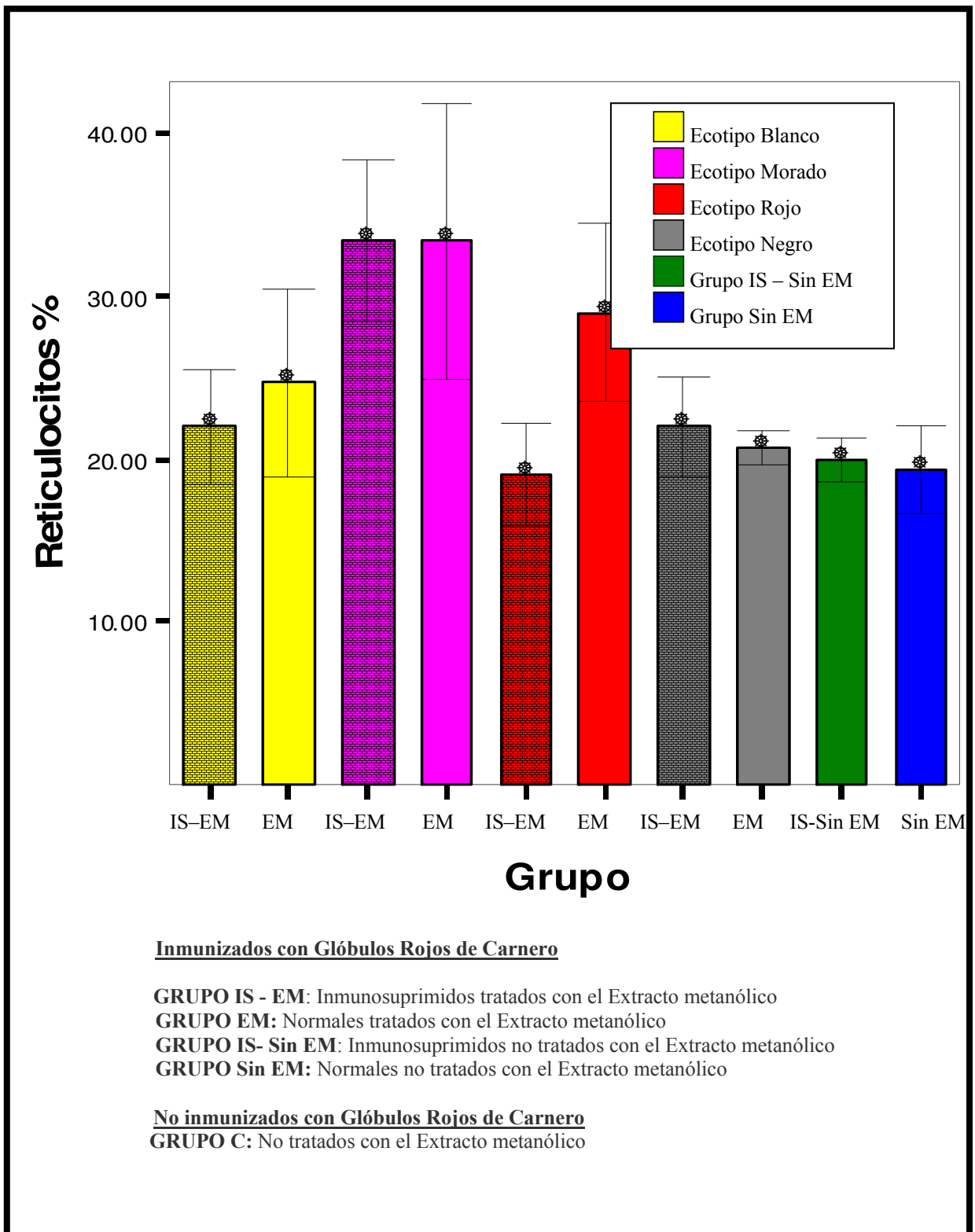


FIGURA 7. COMPARACIÓN DEL PORCENTAJE DE RETICULOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA. Entre ratones Swiss tratados con el extracto metanólico (IS – EM y EM) y ratones no tratados con el extracto metanólico de maca (IS – Sin EM, Sin EM y C).

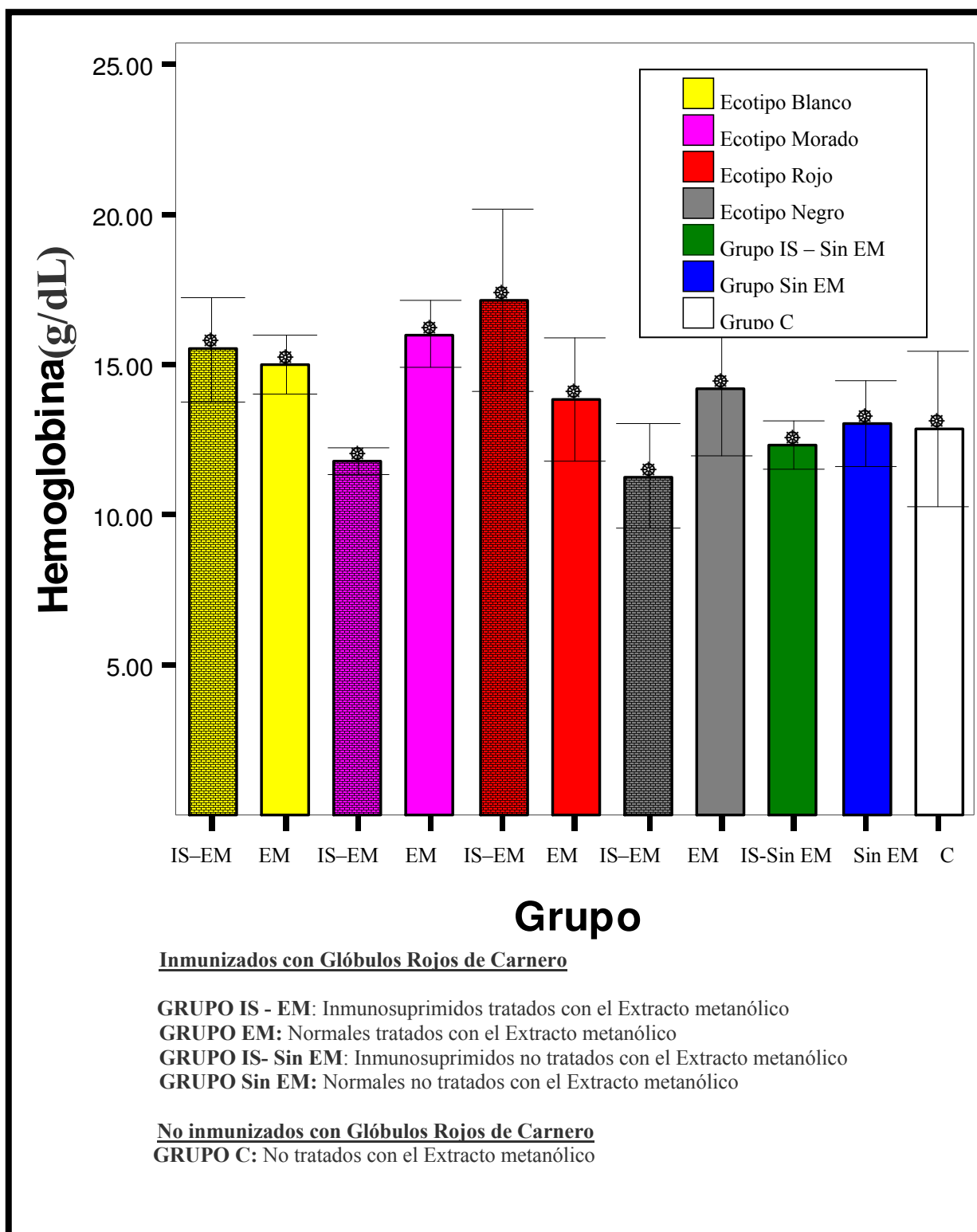


FIGURA 8. COMPARACIÓN DEL NIVEL DE HEMOGLOBINA DE SANGRE PERIFÉRICA. Entre ratones Swiss tratados con el extracto metanólico (IS – EM y EM) y ratones no tratados con el extracto metanólico de maca (IS – Sin EM, Sin EM y C).

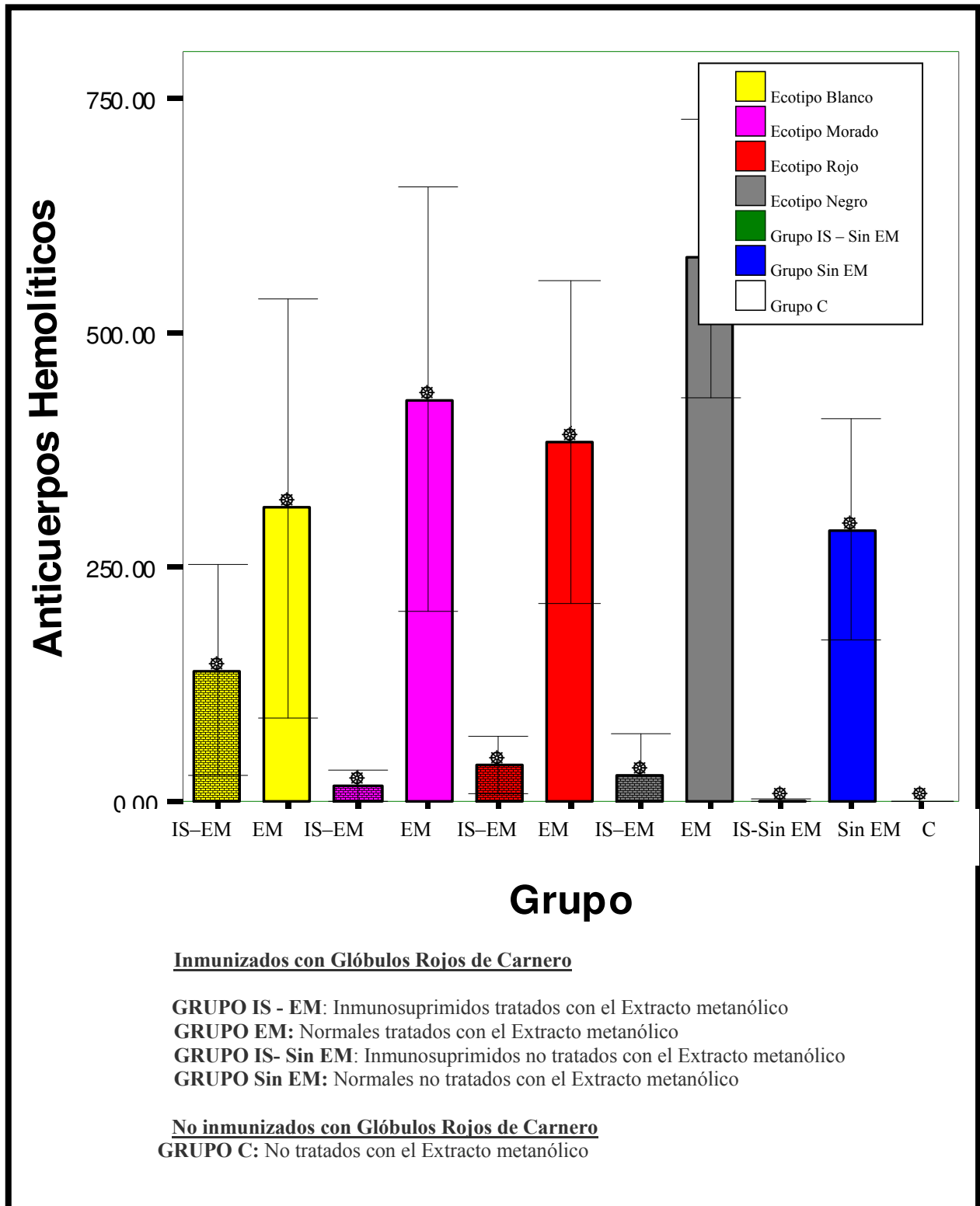


FIGURA 9. COMPARACIÓN DE ANTICUERPOS HEMOLÍTICOS. Entre ratones Swiss tratados con el extracto metanólico (IS – EM y EM) y ratones no tratados con el extracto metanólico de maca (IS – Sin EM, Sin EM y C).

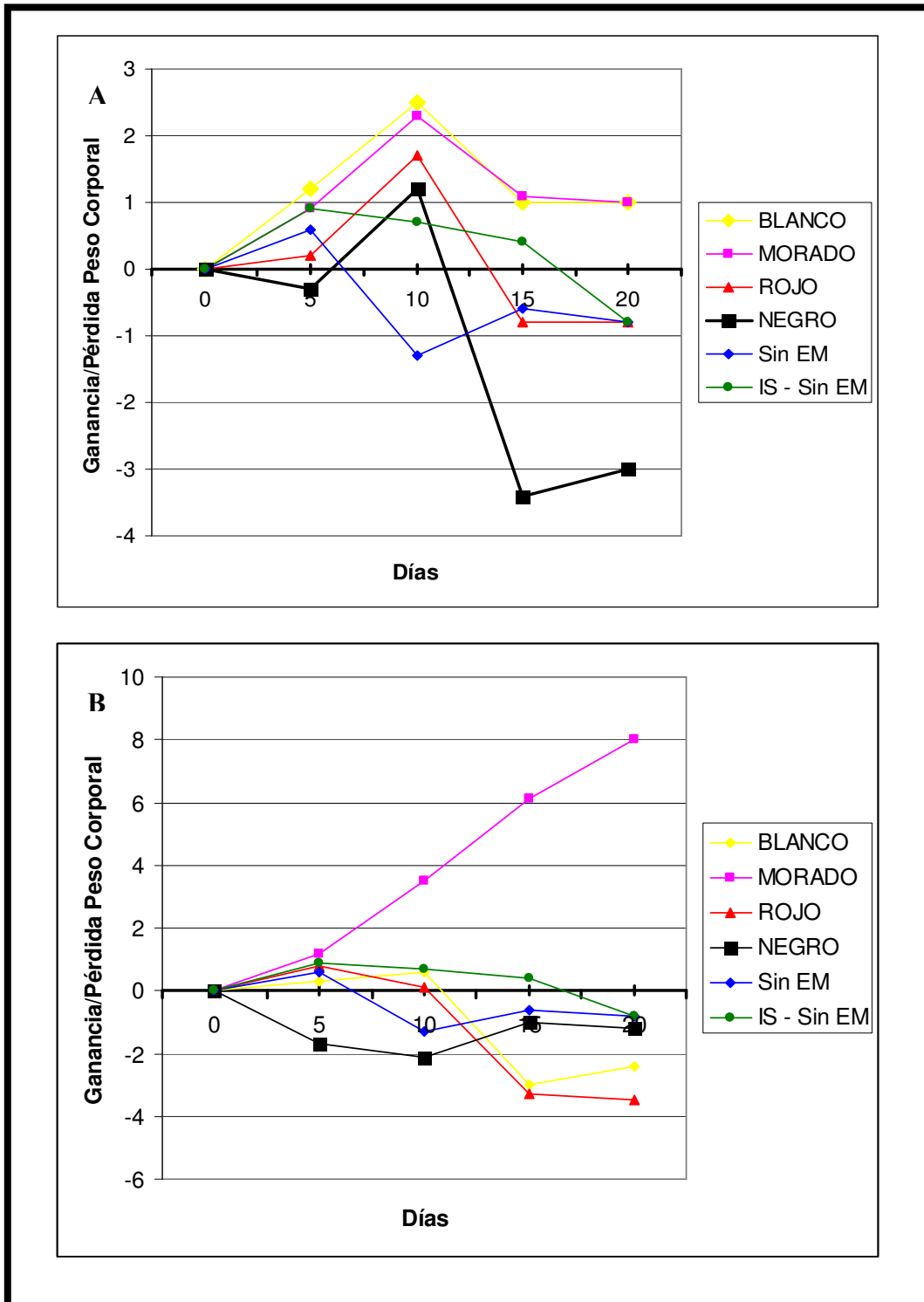


FIGURA 10. EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LOS ECOTIPOS BLANCO, MORADO, ROJO Y NEGRO DE MACA SOBRE LA PÉRDIDA/GANANCIA DE PESO CORPORAL EN RATONES.

- A. En animales no inmunosuprimidos con Ciclofosfamida
- B. En animales inmunosuprimidos con Ciclofosfamida

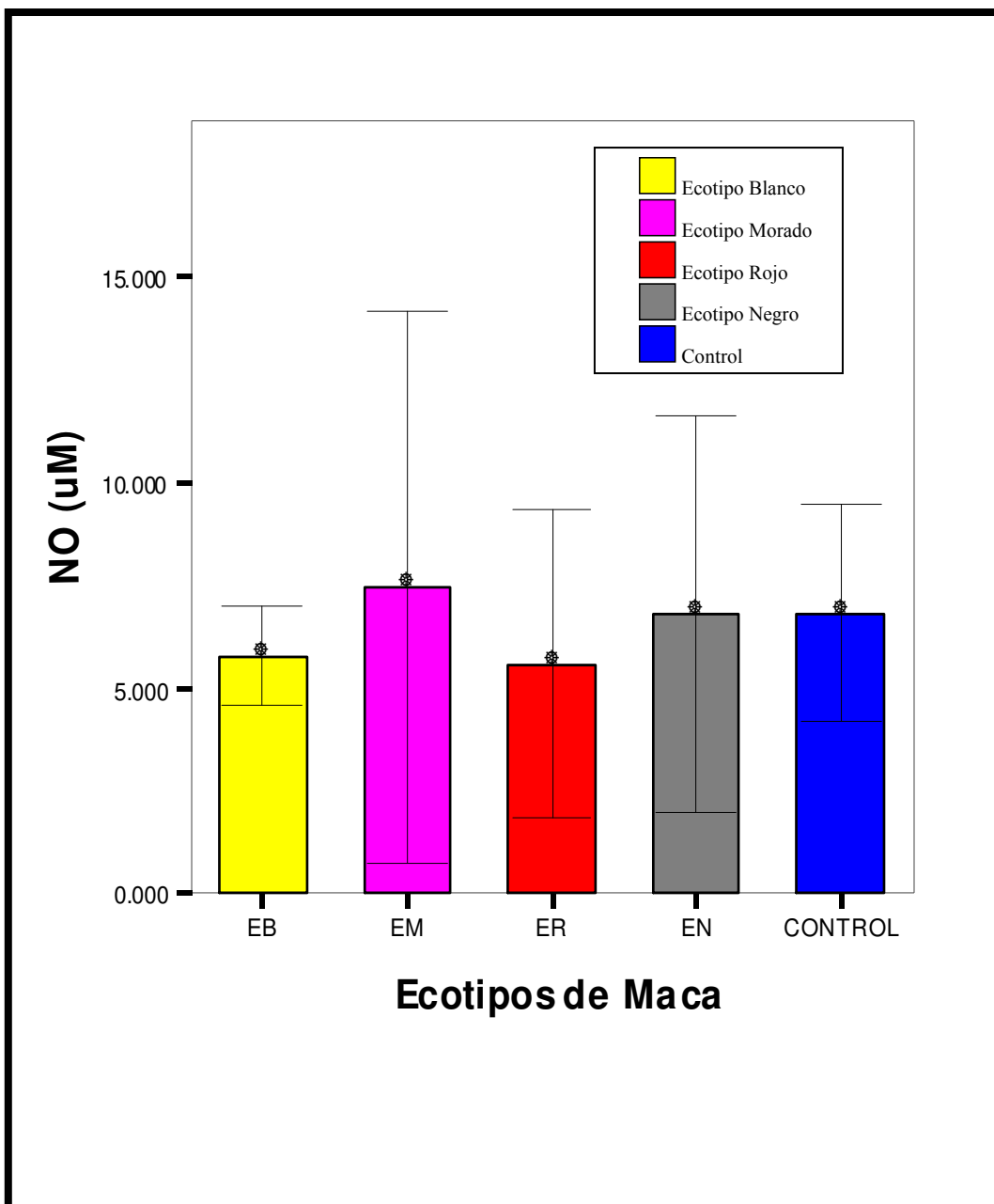


FIGURA 11. EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LOS ECOTIPOS ROJO, BLANCO, MORADO Y NEGRO DE MACA, SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN.

TABLA 1. PROTOCOLO DE TRATAMIENTO CON EXTRACTO METANÓLICO DE MACA EN RATONES INMUNOSUPRIMIDOS CON CICLOFOSFAMIDA. Se aplicó el mismo protocolo al grupo de ratones no inmunosuprimidos.

Edad de inicio del tratamiento con EM: 42 días Peso: 25 – 28 gramos Antígeno GRC 10%: 0.1 ml ip Dosis EM: 300 mg/Kg, Vía oral		
Día N°		Dosis de EM
1		Sí
2		Sí
3		Sí
4		Sí
5		Sí
6		Sí
7		Ninguna
8		Sí
9		Sí
10	GRC 10%	Sí
	0.1 ml ip	
11		Sí
12	*	Sí
13		Sí
14		Ninguna
15		Sí
16		Sí
17		Sí
18		Sí
19		Sí
20	**	Sí

Duración del protocolo: 24 días (3 días en observación y 20 días de tratamiento con el EM)
EM: Extracto metanólico
CF: Ciclofosfamida
GRC: Glóbulos Rojos de Carnero

(*) Inmunosupresión con CF 50 mg/kg (0.1 ml ip)
 (**) Término del protocolo.

TABLA 2. ESTUDIO QUÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE MACA.
 Concentraciones de flavonoides (A), calcio y hierro (B) obtenidas del extracto metanólico de los cuatros ecotipos de maca.

A		
ECOTIPO	FLAVONOIDES (mg/100 g EM)	
BLANCO	2.17	
MORADO	2.20	
ROJO	1.53	
NEGRO	0.88	

B		
ECOTIPO	CALCIO (mg/100 g EM)	HIERRO (mg/100 g EM)
BLANCO	86.80	10.27
MORADO	237.65	6.74
ROJO	8.00	9.11
NEGRO	26.98	0.12

EM: Extracto Metanólico

TABLA 3. EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE MACA SOBRE EL PESO RELATIVO DEL BAZO, TIMO E HÍGADO.
Comparación del promedio (GMT) en los grupos experimentales.

GRUPO	BAZO (g)				TIMO (g)			
	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN
IS – EM	0.25 ± 0.05 a*	0.54 ± 0.06 a, b, c*	0.29 ± 0.07	0.31 ± 0.04	0.02 ± 0.01 a, b, c*	0.14 ± 0.01 a, b, c*	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.02
IS – sin EM	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
EM	0.32 ± 0.05	0.30 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.29 ± 0.04	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.01 a	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Sin EM	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02
C	0.31 ± 0.09	0.31 ± 0.09	0.31 ± 0.09	0.31 ± 0.09	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.04	0.08 ± 0.04

Inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO IS - EM: Inmunosuprimidos tratados con el Extracto metanólico
GRUPO IS - sin EM: Inmunosuprimidos no tratados con el Extracto metanólico
GRUPO EM: Normales tratados con el Extracto metanólico
GRUPO Sin EM: Normales no tratados con el Extracto metanólico

No inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO C: No tratados con el Extracto metanólico

EB: Ecotipo Blanco

EM: Ecotipo Morado

ER: Ecotipo Rojo

EN: Ecotipo Negro

^a p < 0.05 cuando es comparado con el Grupo IS - sin EM

^b p < 0.05 cuando es comparado con el Grupo Sin EM

^c p < 0.05 cuando es comparado con el Grupo C

*p < 0.05 cuando es comparado el Grupo IS – EM con el grupo EM

TABLA 4. EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO SOBRE EL PESO RELATIVO DE HIGADO, TESTÍCULOS Y VESÍCULAS SEMINALES. Comparación del promedio (GMT) en los grupos experimentales.

GRUPO	HÍGADO (g)				TESTÍCULOS (g)				VESÍCULAS SEMINALES (g)			
	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN
IS – EM	5.58 ±	5.95 ±	4.51 ±	4.84 ±	0.77 ±	0.56 ±	0.79 ±	0.73 ±	0.26 ±	0.50 ±	0.25 ±	0.32 ±
	0.36 b, c*	0.56 a, b, c*	0.42 a	0.29 *	0.12	0.07 a, b*	0.05 c	0.08 *	0.10 b, c*	0.11 a, b*	0.02 b, c*	0.16 b*
IS – sin EM	5.12 ±	5.12 ±	5.12 ±	5.12 ±	0.77 ±	0.77 ±	0.77 ±	0.77 ±	0.32 ±	0.32 ±	0.32 ±	0.32 ±
	0.45 b	0.45 b	0.45 b	0.45 b	0.12	0.12	0.12	0.12	0.07 b	0.07 b	0.07 b	0.07 b
EM	4.60 ±	4.87 ±	4.61 ±	4.24 ±	0.83 ±	0.83 ±	0.79 ±	0.81 ±	0.77 ±	0.68 ±	0.52 ±	0.56 ±
	0.60	0.41	0.38	0.13 a	0.07 b, c	0.08 c	0.03 c	0.04 b, c	0.16 a, c	0.08 a, c	0.06 a, b, c	0.02 a, b, c
Sin EM	4.47 ±	4.47 ±	4.47 ±	4.47 ±	0.73 ±	0.73 ±	0.73 ±	0.73 ±	0.72 ±	0.72 ±	0.72 ±	0.72 ±
	0.33 a	0.33 a	0.33 a	0.33 a	0.07	0.07	0.07	0.07	0.10 a, c	0.10 a, c	0.10 a, c	0.10 a, c
C	4.53 ±	4.53 ±	4.53 ±	4.53 ±	0.62 ±	0.62 ±	0.62 ±	0.62 ±	0.41 ±	0.41 ±	0.41 ±	0.41 ±
	0.40	0.40	0.40	0.40	0.07	0.07	0.07	0.07	0.05 b	0.05 b	0.05 b	0.05 b

Inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO IS - EM: Inmunosuprimidos tratados con el Extracto metanólico
 GRUPO IS - sin EM: Inmunosuprimidos no tratados con el Extracto metanólico
 GRUPO EM: Normales tratados con el Extracto metanólico
 GRUPO Sin EM: Normales no tratados con el Extracto metanólico **No**

inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO C: No tratados con el Extracto metanólico

EB: Ecotipo Blanco

EM: Ecotipo Morado

ER: Ecotipo Rojo

EN: Ecotipo Negro

^ap < 0.05 cuando es comparado con el Grupo IS - sin EM

^bp < 0.05 cuando es comparado con el Grupo Sin EM

^cp < 0.05 cuando es comparado con el Grupo C

*p < 0.05 cuando es comparado el Grupo IS – EM con el grupo EM

TABLA 5. EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO SOBRE LA CELULARIDAD DEL BAZO, TIMO Y MÉDULA ÓSEA.
Comparación del promedio (GMT) en los grupos experimentales.

GRUPO	BAZO (10 ⁶)				TIMO (10 ⁶)				MÉDULA ÓSEA (10 ⁶)			
	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN
IS – EM	214.47 ± 42.91 *	550.4 ± 111.06 a, b, c*	222.79 ± 57.98	292.85 ± 46.67	20.7 ± 4.68 b, c	171.63 ± 27.41 a, b, c*	17.97 ± 4.86 b, c*	26.46 ± 7.31 b	34.07 ± 7.21 c	23.54 ± 6.64 *	25.79 ± 6.66	28.97 ± 5.82 c
IS – sin EM	283.20 ± 92.72	283.20 ± 92.72	283.20 ± 92.72	283.20 ± 92.72	28.84 ± 11.97	28.84 ± 11.97	28.84 ± 11.97	28.84 ± 11.97	25.55 ± 7.50	25.55 ± 7.50	25.55 ± 7.50	25.55 ± 7.50
EM	269.33 ± 33.35	234.53 ± 71.16	299.20 ± 79.78	234.00 ± 11.02	40.27 ± 24.23	47.27 ± 12.48 a	30.43 ± 1.95 b	29.47 ± 6.72 b	28.28 ± 9.02 c	35.58 ± 6.34 a, c	30.02 ± 4.95 c	20.37 ± 8.28
Sin EM	252.48 ± 170.82	252.48 ± 170.82	252.48 ± 170.82	252.48 ± 170.82	38.60 ± 4.80	38.60 ± 4.80	38.60 ± 4.80	38.60 ± 4.80	38.52 ± 17.79 c	38.52 ± 17.79 c	38.52 ± 17.79 c	38.52 ± 17.79 c
C	254.32 ± 53.55	254.32 ± 53.55	254.32 ± 53.55	254.32 ± 53.55	34.44 ± 9.30	34.44 ± 9.30	34.44 ± 9.30	34.44 ± 9.30	18.60 ± 4.09 b	18.60 ± 4.09 b	18.60 ± 4.09 b	18.60 ± 4.09 b

Inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO IS - EM: Inmunosuprimidos tratados con el Extracto metanólico

GRUPO IS - sin EM: Inmunosuprimidos no tratados con el Extracto metanólico

GRUPO EM: Normales tratados con el Extracto metanólico

GRUPO Sin EM: Normales no tratados con el Extracto metanólico

No inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO C: No tratados con el Extracto metanólico

EB: Ecotipo Blanco

EM: Ecotipo Morado

ER: Ecotipo Rojo

EN: Ecotipo Negro

^ap< 0.05 cuando es comparado con el Grupo IS - sin EM

^bp< 0.05 cuando es comparado con el Grupo Sin EM

^cp< 0.05 cuando es comparado con el Grupo C

*p< 0.05 cuando es comparado el Grupo IS – EM con el grupo EM

TABLA 6. EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO SOBRE EL RECuento TOTAL Y DIFERENCIAL DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA. Comparación del promedio (GMT) en los grupos experimentales.

GRUPO	LEUCOCITOS (10 ³ /mm ³)				Linfocitos (%)				Mixtas (%)				Granulocitos (%)			
	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN
IS – EM	5.58 ±	6.66 ±	3.95 ±	2.95 ±	84.25 ±	88.90 ±	82.60 ±	82.47 ±	9.92 ±	4.84 ±	9.72 ±	7.17 ±	5.83 ±	6.26 ±	7.68 ±	10.36 ±
	1.88 a, b, c	1.78 a, b, c	1.40	1.03 *	5.36	7.04	6.44	4.91	5.13	3.3	6.5	2.31	1.56	3.95	3.25	2.77
IS – sin EM	3.36 ±	3.36 ±	3.36 ±	3.36 ±	77.23 ±	77.23 ±	77.23 ±	77.23 ±	9.46 ±	9.46 ±	9.46 ±	9.46 ±	13.31 ±	13.31 ±	13.31 ±	13.31 ±
	0.33	0.33	0.33	0.33	1.68	1.68	1.68	1.68	0.71	0.71	0.71	0.71	1.33	1.33	1.33	1.33
EM	5.00 ±	5.80 ±	4.40 ±	5.30 ±	89.97 ±	92.40 ±	90.07 ±	91.33 ±	3.27 ±	3.10 ±	3.47 ±	2.93 ±	6.77 ±	4.50 ±	6.47 ±	5.73 ±
	1.21 a, b, c	2.79	0.82 a	1.38 a, b, c	6.24	3.13	1.33	3.20	2.00	0.94	0.29	1.15	4.29	2.52	1.46	2.07
Sin EM	3.58 ±	3.58 ±	3.58 ±	3.58 ±	80.94 ±	80.94 ±	80.94 ±	80.94 ±	6.52 ±	6.52 ±	6.52 ±	6.52 ±	12.54 ±	12.54 ±	12.54 ±	12.54 ±
	0.67	0.67	0.67	0.67	2.96	2.96	2.96	2.96	1.21	1.21	1.21	1.21	1.95	1.95	1.95	1.95
C	3.36 ±	3.36 ±	3.36 ±	3.36 ±	79.72 ±	79.72 ±	79.72 ±	79.72 ±	12.26 ±	12.26 ±	12.26 ±	12.26 ±	8.02 ±	8.02 ±	8.02 ±	8.02 ±
	0.78	0.78	0.78	0.78	5.81	5.81	5.81	5.81	6.84	6.84	6.84	6.84	2.76	2.76	2.76	2.76

Inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO IS - EM: Inmunosuprimidos tratados con el Extracto metanólico

GRUPO IS - sin EM: Inmunosuprimidos no tratados con el Extracto metanólico

GRUPO EM: Normales tratados con el Extracto metanólico

GRUPO Sin EM: Normales no tratados con el Extracto metanólico

No inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO C: No tratados con el EM

EB: Ecotipo Blanco

EM: Ecotipo Morado

ER: Ecotipo Rojo

EN: Ecotipo Negro

^a p< 0.05 cuando es comparado con el Grupo IS - sin EM

^b p< 0.05 cuando es comparado con el Grupo Sin EM

^c p< 0.05 cuando es comparado con el Grupo C

*p< 0.05 cuando es comparado el Grupo IS – EM con el grupo EM

TABLA 7. EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO SOBRE EL RECuento DE ERITROCITOS, RETICULOCITOS, NIVELES DE HEMOGLOBINA Y RECuento DE PLAQUETAS. Comparación del promedio (GMT) en los grupos experimentales.

GRUPO	RETICULOCITOS (%)				ERITROCITOS (10 ⁶ /mm ³)				HEMOGLOBINA (g/dL)				PLAQUETAS (10 ³ /mm ³)			
	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN
IS – EM	21.97	33.42	19.05	22.02	8.91	7.1	10.07	7.10	15.50	11.7	17.15	11.27	362.83	283.0	398.33	169.33
	± 3.39	± 4.7 a, b	± 3.02 *	± 2.95	± 0.73 a, b	± 1.1 *	± 1.63 a, b, c	± 1.01 *	± 1.66 a, b	± 0.42 *	± 2.90 a, b, c	± 1.65 *	± 168.21 a, b, c	± 193.81	± 200.42 a, b, c	± 149.39
IS – sin EM	19.93	19.93	19.93	19.93	7.76	7.76	7.76	7.76	12.31	12.31	12.31	12.31	81.75	81.75	81.75	81.75
	± 0.88	± 0.88	± 0.88	± 0.88	± 0.59	± 0.59	± 0.59	± 0.59	± 0.64	± 0.64	± 0.64	± 0.64	± 13.77 b, c	± 13.77 b, c	± 13.77 b, c	± 13.77 b, c
EM	24.67	33.37	29	20.7	9.48	9.78	8.54	9.02	15.00	16.00	13.83	14.20	312.67	410.33	354.67	284.00
	± 5.56	± 8.1 a, b	± 5.25 a, b	± 0.97	± 0.47 a, b, c	± 0.47 a, b, c	± 1.04	± 1.11 a	± 0.93 a, b, c	± 1.08 a, b, c	± 1.95	± 2.19 a	± 82.86 a, b, c	± 94.88 a, b, c	± 08.67 a, b	± 58.67 a, b, c
Sin EM	19.32	19.32	19.32	19.32	7.83	7.83	7.83	7.83	13.02	13.02	13.02	13.02	126.80	126.80	126.80	126.80
	± 2.2	± 2.2	± 2.2	± 2.2	± 0.65	± 0.65	± 0.65	± 0.65	± 1.13	± 1.13	± 1.13	± 1.13	± 24.69 a	± 24.69 a	± 24.69 a	± 24.69 a
C	-	-	-	-	7.52	7.52	7.52	7.52	12.84	12.84	12.84	12.84	147.40	147.40	147.40	147.40
	-	-	-	-	± 1.13	± 1.13	± 1.13	± 1.13	± 2.08	± 2.08	± 2.08	± 2.08	± 39.58 a	± 39.58 a	± 39.58 a	± 39.58 a

Inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO IS - EM: Inmunosuprimidos tratados con el Extracto metanólico

GRUPO IS - sin EM: Inmunosuprimidos no tratados con el Extracto metanólico

GRUPO EM: Normales tratados con el Extracto metanólico

GRUPO Sin EM: Normales no tratados con el Extracto metanólico

No inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO C: No tratados con el Extracto metanólico

EB: Ecotipo Blanco

EM: Ecotipo Morado

ER: Ecotipo Rojo

EN: Ecotipo Negro

^ap < 0.05 cuando es comparado con el Grupo IS - sin EM

^bp < 0.05 cuando es comparado con el Grupo Sin EM

^cp < 0.05 cuando es comparado con el Grupo C

*

TABLA 8. EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES Y HEMOLÍTICOS. Comparación del promedio (GMT) en los grupos experimentales.

GRUPO	ANTICUERPOS HEMAGLUTINANTES				ANTICUERPOS HEMOLÍTICOS (Fijadores de Complemento)			
	EB	EM	ER	EN	EB	EM	ER	EN
IS – EM	138.67 ±	74.67 ±	80.00 ±	24.00 ±	140.70 ±	17.73 ±	39.17 ±	29.18 ±
	94.21 b, c*	26.13 b, c*	39.19 b, c*	8.76 a, b, c*	91.39 a, b, c	13.06 a, b, c*	24.61 a, b, c*	34.61 b*
IS – sin EM	83.20 ±	83.20 ±	83.20 ±	83.20 ±	1.55 ±	1.55 ±	1.55 ±	1.55 ±
	42.93 b, c	42.93 b, c	42.93 b, c	42.93 b, c	1.23 b, c	1.23 b, c	1.23 b, c	1.23 b, c
EM	3413.33 ±	2730.67 ±	3072.00 ±	2218.67 ±	313.52 ±	429.17 ±	384.61 ±	580.43 ±
	1057.58 a, c	1057.58 a, c	1586.37 a, c	1608.26 a, c	179.42 a, c	182.01 a, c	138.52 a, c	119.50 a, b, c
Sin EM	2560.00 ±	2560.00 ±	2560.00 ±	2560.00 ±	290.44 ±	290.44 ±	290.44 ±	290.44 ±
	1536.00 a,	1536.00 a,	1536.00 a,	1536.00 a,	95.36 a, c	95.36 a, c	95.36 a, c	95.36 a, c
C	0 a, b	0 a, b	0 a, b	0 a, b	0 a, b	0 a, b	0 a, b	0 a, b

Inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO IS - EM: Inmunosuprimidos tratados con el Extracto metanólico
GRUPO IS - sin EM: Inmunosuprimidos no tratados con el Extracto metanólico

GRUPO EM: Normales tratados con el Extracto metanólico
GRUPO Sin EM: Normales no tratados con el Extracto metanólico

No inmunizados con Glóbulos Rojos de Carnero

GRUPO C: No tratados con el Extracto metanólico

EB: Ecotipo Blanco
EM: Ecotipo Morado
ER: Ecotipo Rojo
EN: Ecotipo Negro

^ap< 0.05 cuando es comparado con el Grupo IS - sin EM

^bp< 0.05 cuando es comparado con el Grupo Sin EM

^cp< 0.05 cuando es comparado con el Grupo C

*p< 0.05 cuando es comparado el Grupo IS – EM con el grupo EM

ADDENDA

1. SOLUCIÓN SALINA 1X

- Pesar 8.5 g de NaCl.
- Medir 800 ml de agua destilada en una probeta y trasvasar el agua a un recipiente.
- Agregar la sal al recipiente lentamente con un bagueta. Cuando la sal está disuelta; trasvasar el contenido del recipiente a otro recipiente de 1000 ml.
- Agregar los últimos 200 ml.
- Mezclar la solución en el recipiente de 1000 ml y trasvasar a un frasco. Rotular el frasco.

2. REACTIVO DE PETER 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.