

Bio-ensayo como marcador de la actividad biológica de la maca negra

Por: Gustavo F. Gonzales^{1,2}, Vanessa Vásquez¹

Resumen

Objetivo: El objetivo del estudio es desarrollar un bioensayo para evaluar la actividad biológica de la maca para lo cual se trata de determinar un método cuyos resultados puedan demostrarse al menor tiempo, y que tenga una buena sensibilidad y especificidad. Los parámetros biológicos a ser evaluados incluyen a la Producción Diaria de Espermatozoides (PDE), el conteo de espermatozoides en epidídimo y el conteo de espermatozoides en conducto deferente de rata macho adulta.

Material y métodos: Se ha evaluado la respuesta biológica a diferentes extractos acuosos de maca negra a los días 1, 3 y 5 de tratamiento. El tiempo más corto de mayor respuesta se observa a los 3 días donde el conteo de espermatozoides se incrementa en casi el 100%. Con este tiempo de administración se procede a desarrollar el bio-ensayo comparando 3 variedades de maca (roja, amarilla y negra).

Resultados: Las pruebas de especificidad y sensibilidad demuestran que el punto de corte (la media del valor control para cada parámetro evaluado) es adecuado obteniéndose la mejor sensibilidad (80.43%) y especificidad (75%) a nivel del conducto deferente, corroborada con una curva ROC de 0.79, una cifra bastante buena que señala una alta tasa de discriminación de los verdaderos positivos con respecto a los falsos positivos, en este caso mayor cantidad de espermatozoides por efecto de la maca. Con el uso de este bio-ensayo se ha logrado demostrar diferencias biológicas entre macas producidas en 3 zonas distintas (Ninacaca, Carhuamayo, Chupaca) y entre productos de maca obtenidos de expendios comerciales, particularmente en mercados demostrándose la ausencia de actividad de diversos productos consumidos por el público.

Conclusión: El bio-ensayo desarrollado tiene una buena sensibilidad y especificidad y puede ser utilizado para la evaluación de derivados de maca discriminando particularmente la maca negra y en menor proporción la amarilla, las cuales tienen efecto sobre el número de espermatozoides.

Palabras Clave: Bioensayo, Maca Negra, Conteo de Espermatozoide

Abstract

Objetive: The aim of this study is to develop a bioassay to evaluate the biological activity of maca, which includes developing a method to evaluate biological parameters in the shortest time having a good sensitivity and specificity. The biological parameters to be evaluated include: daily sperm production (DSP), sperm count in epididymis, and sperm count in the vas deferens of adult male rats.

Material and methods: It has been evaluated the biological response to different aqueous extracts of black maca at days 1, 3 and 5 of treatment. The shortest time with greatest response was observed at day 3, where the sperm count was increased in almost 100%. With this administration time it is proceeded to develop a bioassay comparing three different varieties of maca (red, yellow and black).

Results: The specificity and sensibility analysis shows that the cut point (the average of the value control for each parameter evaluated) is adequate obtaining the best sensitivity (80.43 %) and specificity (75 %) in the vas deferens, corroborated with a ROC curve of 0.79, which is a good value that gives a high rate of discrimination of the true positives in respect with the false positives, in this case a greatest amount of sperm due to the maca effect. With the use of this bioassay, it has been able to demonstrate biological differences between maca produced in three different zones (Ninacaca, Carhuamayo and Chupaca) and between the maca products obtained from commercial outlets such as markets, demonstrating the absence of activity of such products consumed by the public.

¹ Facultad de Ciencias y Filosofía Universidad Peruana Cayetano Heredia.

² Instituto de Investigaciones de la Altura Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Conclusion: The bio-assay developed has a good sensitivity and specificity and can be used for the evaluation of maca derivates discriminating particularly black maca and in less proportion the yellow maca, which has an effect over the sperm count.

Key words: Bio-assay, Black Maca, Sperm count.

INTRODUCCION

El *Lepidium meyenii* (maca) es una crucífera (Familia Brassicaceae) que es conocida desde hace más de 1000 años en los Andes centrales y fueron los españoles los que la describieron por primera vez en el Siglo XVII indicando que esta planta sólo crece en la meseta de Chinchaycocha en los Andes Centrales del Perú (Cobo, 1653). Bernabé Cobo, Jesuita español en su libro Historia del Nuevo Mundo describe a la maca como una planta que crece en condiciones tan difíciles donde ninguna otra planta puede crecer y que es utilizada como nutriente por los pobladores de la zona y por su capacidad fertilizante (Cobo, 1653). Existen otras narraciones posteriores sobre la maca ubicándola siempre en las zonas de los Andes centrales particularmente en la zona de Óndores, Ninacaca y Carhuamayo (ver Valerio y Gonzales, 2005) por encima de los 4000 m de altitud.

La parte comestible de la planta es el hipocótilo la cual luego de ser deshidratada de manera natural en el medio ambiente es luego hervida por algunas horas. Los hipocótilos luego de deshidratado pueden ser guardados previo a su uso hasta por 7 años (Valerio y Gonzales, 2005).

Gloria Chacón, bióloga peruana, fue la primera en describir de manera científica las propiedades que tiene la maca sobre la fertilidad en hembras y machos (Chacón, 1961). La planta fue descrita botánicamente por Walpers en el siglo XVIII en las zonas alto-andinas del sur (Pisacoma), lugar donde usualmente no es encontrada esta planta en la actualidad; más aún, el eje hipocótilo-raíz de la planta descrita por Walpers difiere morfológicamente de la observada en los Andes centrales por lo que se ha sugerido que se trata de una planta diferente y en varios foros se le denomina *Lepidium Peruvianum* Chacón (Chacón, 1990).

En los últimos años ha habido un incremento notable en la producción y exportación de

maca en diferentes formas desde harina hasta productos farmacéuticos elaborados (Gonzales y col, 2006). Muchos de los productos que se expenden carecen sin embargo de control de calidad que permitan garantizar que el usuario está efectivamente adquiriendo un producto obtenido en base a maca, o que en todos los casos estén consumiendo la cantidad de maca biológicamente activa que refiere el producto comercial.

En un intento de tener patrones de referencia para un adecuado control de calidad, se han generado diversos marcadores químicos como los bencil-glucosinolatos (Li y col, 2001; Dini y col, 2002) y más recientemente las macamidas (McCullom y col, 2005). El uso de estos marcadores ha permitido determinar que los productos comerciales de maca difieren notablemente en su contenido. Más recientemente Gonzales y col, (2006, en prensa) ha demostrado que utilizando los glucosinolatos como marcadores químicos de la maca, si se controla este parámetro en dos lotes diferentes, la respuesta biológica difiere. Es decir, si administráramos maca de dos lotes diferentes a las ratas conteniendo cada lote una dosis de 0.1 mg de glucosinolatos se observan diferencias biológicas entre dos lotes diferentes a pesar de tener ambas la misma cantidad de glucosinolatos. Esto nos indica que no necesariamente el controlar la maca en razón a un marcador químico se obtendrá respuestas biológicas similares por lo que se hace necesario desarrollar métodos biológicos simples y rápidos que permitan evaluar *in vivo* la actividad de la maca, y puedan ser utilizados como bio-ensayos de control de calidad de la maca. Igualmente el contenido de glucosinolatos en crucíferas que crecen en el mismo sitio por dos años pero obtenidas bajo condiciones climáticas difieren entre si (Ciska y col, 2000) indicando la necesidad de tener marcadores más directos como es la propia respuesta biológica.

Por otro lado el hecho de que diferentes variedades de maca muestren actividades biológicas diferentes hace necesario tener un bio-ensayo que las permita identificar. Se ha demostrado que la maca negra tiene un mayor efecto sobre el conteo de espermatozoides en tanto que la amarilla tiene un efecto aunque positivo pero de menor magnitud en tanto que la maca roja carece de dicha función (Gonzales C y col, 2006) en tanto que la maca roja disminuye el tamaño de la próstata en la hiperplasia prostática inducida por enantato de testosterona, lo cual no se observa con la maca negra (Gonzales y col, 2005). Cuando las macas de estas 3 variedades son pulverizadas no es fácil identificar a que variedad pertenece (Gonzales, 2006), por lo que se hace necesario contar con un bio-ensayo que permita identificarlos.

Ante la necesidad de desarrollar un bio-ensayo se ha diseñado el presente estudio donde basado en el efecto de la maca en aumentar la producción diaria de espermatozoides en testículo (Gonzales C y col, 2006), el contenido de espermatozoides en epidídimos (Cheng y col, 2005) y el conteo de espermatozoides en conducto deferente (Rubio y col, 2006), se han evaluado estos 3 parámetros de respuesta para obtener un marcador biológico y rápido de la actividad de la maca.

Para ello se ha analizado el efecto de 3 ecotipos de maca de las cuales se conocen que dos tienen efecto sobre la espermogénesis, la negra y la amarilla, y una carece de dicho efecto, la roja (Gonzales C y col, 2006). Se ha planteado evaluar el efecto luego de 1, 3 y 5 días de tratamiento por vía oral en ratas machos adultas sanas con la finalidad de determinar la mejor respuesta biológica en el menor tiempo de experimentación. Sobre esta base se ha determinado que marcador biológico resulta más adecuado en términos de sensibilidad y especificidad.

Una vez determinado el bio-ensayo se ha procedido a evaluar productos de maca obtenidos de expendios comerciales en forma de harina tratando de determinar si tienen diferente respuesta biológica al ser comparado con el control (vehículo) y la maca standard procesada en el laboratorio (Standard de Referencia).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se han utilizado ratas de 4 meses de la raza Holtzman obtenidos del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las ratas fueron divididas de manera randomizada en grupo control (vehículo) y grupo de tratamiento. En cada experimento para demostrar la actividad biológica de la maca se utilizó como grupo de comparación al control, el que solo recibió vehículo (agua) por vía oral. El número de ratas que se utilizó por cada grupo de investigación fueron de 6 animales.

Las ratas son colocadas en un ambiente adecuado y mantenidos en un número de seis por caja. La temperatura del ambiente es de 22°C con un ciclo de luz oscuridad de 12:12 h. Las ratas son alimentadas con Purina preparada para animales de laboratorio denominado "papeadito", todos los animales cumplen con el régimen de alimentación y agua ad libitum. Todos los animales (control y tratados) reciben el mismo tipo de alimento, por lo que no hay riesgo de un efecto producido por el alimento.

Los animales son tratados de acuerdo a los estándares del Instituto Nacional de Salud, para el cuidado y el uso de animales de laboratorios. (National Research Council, 1996).

Diseño

El diseño es experimental donde compara un grupo control tratado con vehículo y un grupo experimental donde recibe la maca en diferentes formas de preparación tanto la procesada en nuestro laboratorio (Referencia) como aquella adquirida en diferentes expendios comerciales. Se ha evaluado igualmente el efecto de maca obtenido de diferentes lugares de producción (Ninacaca, Pasco; Carhuamayo, Junín; Chupaca, Yanacancha).

La primera parte del estudio consiste en demostrar el tiempo más corto y efectivo en que se puede tener un bio-ensayo utilizando para ello la administración de maca por 1, 3 y 5 días y evaluando los parámetros biológicos 24 horas después de la administración. Para este propósito se ha utilizado la maca negra la cual se ha demostrado ser efectiva en aumentar el

número de espermatozoides (Gonzales C y col, 2006).

Para el caso de la evaluación de maca obtenida de diferentes lugares de producción se ha evaluado tanto a la maca negra, roja como amarilla, todas procedentes de Ninacaca, Carhuamayo y Chupaca. Estos 3 lugares se diferencian por la altitud, siendo la de mayor altitud Ninacaca (4246 m) y la de menor altitud Chupaca (3846 m). En la actualidad la de mayor producción y la más utilizada es la maca de Carhuamayo (3846 m) (Gonzales y col, 2006).

En ambos experimentos la dosis utilizada para el tratamiento de los animales es el equivalente a 1 g de maca seca/Kg peso corporal. Esta dosis se ha demostrado que es efectiva en aumentar el conteo de espermatozoides en epidídimos (Gonzales y col, 2004; Chung y col, 2005). A menos que se refiera lo contrario, todas las presentaciones de maca son disueltas en agua para su administración.

Para la evaluación de los preparados de maca obtenidos de diferentes fuentes comerciales se compara tanto con el grupo control como con nuestro Standard de referencia que es un patrón preparado en nuestro laboratorio (extracto acuoso hervido liofilizado). Este Standard es considerado como control positivo. En todos los casos de productos adquiridos comercialmente, dichos preparados expendidos en polvo son disueltos en agua. En todos los casos se establece una dosis de administración equivalente a 1 gramo de la harina de maca/Kg de peso.

Preparación del extracto acuoso de hipocótilos de *Lepidium meyenii* Maca

Los hipocótilos de maca deshidratados naturalmente son adquiridos de su lugar de origen (Ninacaca, Carhuamayo o Chupaca). Estas zonas se encuentran entre 3846 m y 4246 m de altitud en

los Andes centrales en Pasco y Junín respectivamente. La identidad de la planta ha sido autenticada por evaluación morfológica de la etnobotánica Irma Fernández, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Una muestra está depositada en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas con el número de voucher IFV2374.

Los hipocótilos secos según cada variedad (negra, amarilla o roja) son pulverizados por separado en un Molino. El pulverizado es colocado en una bolsa especial la que a su vez es introducida a un recipiente con agua y se procede al hervido por dos horas. El agua cocida de maca es dejada a enfriar y luego es filtrada y si es necesario centrifugada para eliminar restos sólidos. El filtrado es mantenido luego a -20°C y posteriormente a -70°C para proceder a la liofilización.

Previo a los experimentos se disuelve el liofilizado de maca para obtener una concentración equivalente a 333 mg maca deshidratada/ml.

Preparación del extracto acuoso de hojas de *Lepidium meyenii* Maca

Se separó la maca por variedades (amarillo, morado, negro y rojo), para luego proceder a separar las hojas del hipocótilo, se procedió a su lavado y luego el secado a temperatura ambiente por un día y posteriormente se utilizó la estufa a una temperatura de 30°C por un tiempo de 30 minutos. Una vez secas las hojas se proceden a la molienda. Las hojas pulverizadas son colocadas en una bolsita blanca de tela filtrante. Luego se coloca en un beaker agua destilada según la cantidad requerida para cada hoja de la variedad de maca (ver cuadro), posteriormente se lleva el beaker a una hornilla eléctrica y se deja por un tiempo de 45 minutos, una vez transcurrido el tiempo se saca del fuego y se coloca la bolsita filtrante que contiene la maca, se tapa y se deja reposar por dos horas.

I.- CANTIDADES UTILIZADAS

VARIEDAD	Cantidad utilizada en (gr)	Cantidad Utilizada de agua destilada en (ml)	Cantidades Recuperadas en Extracto Acuoso (ml)
Hojas de Maca Amarilla	37.30	559.5	422
Hojas de Maca Morada	17.90	268.5	149
Hojas de Maca Negra	22.00	330.00	166
Hojas de Maca Roja	31.00	465.00	288

Una vez transcurrido el tiempo mencionado se procede a filtrar de tal forma que no quede nada de extracto acuoso en la bolsa, luego se mide el volumen obtenido y posteriormente proceder a evaluar la cantidad que se utilizará.

Se administra el equivalente a 50 mg hojas secas/ ml. Una vez calculado, diluido, separado y rotulado en los frascos cada dosis se procede a la administración a los animales. La administración es equivalente a 0.2 gr hojas secas/kg. Se les inoculó por tres días.

Protocolo Experimental.

Para la evaluación del tiempo óptimo para uso como bio-ensayo se ha evaluado el efecto de los hipocótilos de maca negra administrada en dosis de 2 g/Kg por 1, 3, ó 5, días.

Para la administración de la maca se utilizó una aguja de intubación nasogástrica N° 18 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania). En ella se administraba alrededor de 2 ml de agua (con o sin maca). Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética Institucional. Un día después del último tratamiento las ratas fueron eutanasias. Para el resto de los experimentos se utiliza una dosis de hipocótilos de maca de 1 gr/Kg con la finalidad de poder establecer diferencias entre las 3 variedades de maca y entre maca de diferentes procedencias. Ambas dosis han sido probadas previamente (Chung y col, 2005; Gonzales y col, 2006). Para el caso de las hojas se usa 0.2 g/kg.

Parámetros de Evaluación

Los parámetros de evaluación biológica que servirán de marcadores de la actividad in vivo de la maca son los siguientes:

1. Producción diaria de espermatozoides (PDE)
2. Conteo de espermatozoides en epidídimo
3. Conteo de espermatozoides en conducto deferente

Producción Diaria de Espermatozoides

Los testículos son homogenizados en 10 ml de una solución salina al 0.9% en 0.05% (v/v) de

Tritón X-100 por 1 minuto en un homogenizador automático. Luego de una dilución 1/10, se cuentan las espermátides elongadas resistentes a la homogenización por testículo. Este proceso se realiza en un hemocitómetro repitiendo el proceso por cuadriplicado.

La producción diaria de espermatozoides (PDE) como la eficiencia (PDE/gramo de testículo) se calcula al dividir el número de espermátides elongadas ó espermátides por gramo de testículo entre 6.3 días que es el período de la espermatogénesis durante los pasos 17-19 de las espermátides obtenidos para ratas Holtzman (Kubota y col. 2003; Takahashi y Oishi, 2003).

La tasa de tránsito epididimario se calcula al dividir el número de espermatozoides en la cola del epidídimo entre la producción diaria de espermatozoides (Dalsenter y col. 2003).

Conteo de Espermatozoides en Epidídimo

El conteo de espermatozoides resistentes a la homogenización se realiza en el cabeza/cuerpo del epidídimo y en la cola (cauda) del epidídimo. La cabeza y cuerpo del epidídimo es cortado y homogenizado separado de la cauda del epidídimo. La homogenización se realiza en 5 ml de solución salina (NaCl 0.9%). Los homogenizados son luego refrigerados por 24 horas para permitir que los espermatozoides pegados a las paredes sean liberadas. Luego se procede a agregar 5 ml de eosina (2%) y agitadas en un vortex. Un mililitro de esta mezcla es diluida con 2 ml de eosina (2%) y esta mezcla se coloca a una cámara Neubauer donde se cuentan en los 25 cuadrados centrales las cabezas de espermatozoides resistentes a la homogenización.

Los espermatozoides contados en los 25 cuadrados se multiplican por 0.06 (espermatozoides X 10⁶/ ml) y luego por 5 ml (espermatozoides X 10⁶/ cabeza+cuerpo o cauda). Este proceso se repite cuatro veces y se obtiene un valor promedio. Los datos son referidos como número de espermatozoides por cabeza/cuerpo del epidídimo o cauda del epidídimo. Para obtener el valor total de espermatozoides en epidídimo se suman ambas fracciones.

Conteo de Espermatozoides en Conducto Deferente

El conducto deferente es disecado en dos partes una correspondiente la porción proximal y otra a la distal. Se distinguen ambas por el diámetro una delgada y la segunda gruesa. Cada parte fue homogenizada con 1 ml de solución salina (0.9%). Una alícuota fue diluida con dos partes de eosina (2%). Se cuentan las cabezas de los espermatozoides resistentes a la homogenización en los 25 cuadrados de la cámara de Neubauer. El conteo se hace por cuadriplicado usando para ello las cuentas en cuatro muestras diferentes. Para el cálculo final se utiliza el promedio de estas 4 mediciones. Los resultados del conteo de cada una de las partes (proximal o distal) son multiplicados por 0.03 y definidos como número de espermatozoides $\times 10^6$ /parte del conducto deferente (grueso o delgado). Los datos son expresados como la cantidad total de espermatozoides en el conducto deferente (Cantidad de espermatozoides en la zona proximal + cantidad de espermatozoides en la zona distal)

Análisis Estadístico

Los datos han sido analizado usando el paquete estadístico STATA (version 8.0) para computadora personal (Stata Corporation, 702 University Drive East, College Station, TX, USA).

Los datos son presentados como media \pm error standard (ES). La homogeneidad de varianza se analiza usando la prueba de Bartlett. Si las varianzas son homogéneas, las diferencias entre grupos se ensayan por análisis de varianza (ANOVA). Si el valor F en el ANOVA es significativo, las diferencias entre pares de medias se calculan a través de la prueba de Scheffé.

Si las variables no fueran homogéneas se hace una transformación de datos para normalizar la curva de distribución o se utiliza la prueba de Kruskal-Wallis (no paramétrico) para determinar diferencias entre grupos. Si el resultado da diferencia significativa, entonces se calcula la diferencia entre par de medianas utilizando la prueba de Mann-Whitney-U.

Se considera como estadísticamente significativo cuando la P<0.05.

La primera parte del estudio consiste en determinar el tiempo más corto en que se observa respuesta biológica con la maca negra, para ello se compara con una prueba t de Student (control vs tratado) el menor tiempo en que se encuentran diferencias en las variables analizadas (Producción diaria de espermatozoides, conteo de espermatozoides en epidídimo y conteo de espermatozoides en deferente).

Como siguiente paso se determina la sensibilidad y especificidad de la prueba para lo cual se utilizarán criterios cualitativos y criterios cuantitativos. Para este propósito, al grupo control se le toma la media aritmética para estimar el punto de corte que servirá de guía para estimar el efecto esperado. Para cada una de las variables de estudio (PDE, conteo de espermatozoides en epidídimo y conteo de espermatozoides en conducto deferente) se realiza un análisis de regresión logística, donde la variable dependiente es dicotómica (1=por encima del punto de corte; 0=igual o debajo del punto de corte). Como variables independientes se encuentran las 3 variedades de maca (negra, roja y amarilla).

Sensibilidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a una muestra de maca que tiene actividad biológica. Es la probabilidad de que para una muestra con actividad biológica se obtenga en la prueba un resultado positivo. La sensibilidad es, por lo tanto, la capacidad del test para detectar los verdaderos positivos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{VP}}{\text{VP}+\text{FN}}$$

VP: verdaderos positivos

FN: Falsos negativos

Especificidad

Es la probabilidad de clasificar correctamente a una muestra que no es maca como carente de la actividad biológica (resultado negativo). La

especificidad como la capacidad para detectar a las muestras que no son maca.

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{VN}}{\text{VN} + \text{FP}}$$

VN: Verdaderos negativos

FP: falsos positivos

Igualmente se obtienen los valores predictivos positivos y valores predictivos negativos y el porcentaje de muestras clasificadas correctamente.

La exactitud y precisión son medidas por el área bajo la curva ROC (Receiver Operating Characteristics). Esta área permite discriminar los verdaderos positivos de los falsos positivos; mientras más cercano estén al valor 1 mejor es el bio-ensayo.

RESULTADOS

Tiempo óptimo para el desarrollo de un bio-ensayo

En la Tabla 1 se puede apreciar que el conteo de espermatozoides en conducto deferente en el día 3 resulta en un incremento en casi el doble del valor basal ($P<0.01$). Esta magnitud de incremento es significativamente superior al observado en el conteo de espermatozoides en epidídimos (día 1), donde la maca negra incrementa los valores controles en tan solo en 1.52 veces ($P<0.01$). El día 5, el aumento del conteo de espermatozoides en el conducto deferente es superior al doble ($P<0.01$).

En base a estos resultados se ha considerado la medición del conteo de espermatozoides en conducto deferente a los 3 días de tratamiento

con maca como el tiempo más corto de tratamiento con una alta respuesta biológica y por lo tanto poder ser usado como marcador de un bio-ensayo.

La tasa de tránsito epididimario no se modifica por acción de la maca.

Sensibilidad y especificidad del bioensayo

Para el estudio de la sensibilidad y la especificidad del bio-ensayo se ha evaluado el efecto de 3 variedades de maca (negra, amarilla y roja) comparadas cada uno con un control. Se han evaluado los parámetros de producción diaria de espermatozoides (PDE), conteo de espermatozoides en epidídimos y conteo de espermatozoides en conducto deferente.

Los resultados de los análisis de regresión logística se encuentran en las Tablas 2-4. Las mediciones de PDE (Tabla 2), Conteo de espermatozoides en epidídimos (Tabla 3) y conteo de espermatozoides en conducto deferente (Tabla 4) muestran que tanto la maca negra como la amarilla aumentan los valores de los parámetros evaluados. En tanto que la maca roja sólo mostró respuesta positiva a nivel del conducto deferente. De las 3 variedades de maca, la negra es la que muestra la mejor respuesta con ORs de 16.33 para PDE (Tabla 2), 8.67 para conteo de espermatozoides en epidídimos (Tabla 3) y 23.33 para conteo de espermatozoides en conducto deferente (Tabla 4).

Las pruebas de especificidad y sensibilidad demuestran que el punto de corte (la media del valor control para cada parámetro evaluado) es adecuado obteniéndose la mejor sensibilidad (80.43%) y especificidad (75%) a nivel del conducto deferente, corroborada con una curva

Tabla 1. Producción diaria de espermatozoides, conteo de espermatozoides en epidídimos y conteo de espermatozoides en conducto deferente en ratas que reciben maca (1 g/Kg) o vehículo (control) por 1, 3 ó 5 días.

Conteo de SPZ	Día 1		Día 3		Día 5	
	Control	Maca negra	Control	Maca negra	Control	Maca negra
C. Deferente	7.06±0.94	9.57±1.35	5.81±0.87	11.56±1.68*	6.54±0.69	15.95±0.26*
Epidídimo	104.86±11.72	159.42±12.84*	157.06±10.93	184.50±10.12	211.48±23.97	155.54±12.55**
PDE	19.30±1.73	16.85±1.22	17.59±1.17	18.33±0.88	18.49±1.19	19.71±0.50

SPZ: Espermatozoides. Definido en millones de espermatozoides. PDE: Producción diaria de espermatozoides. Datos son promedios ± error Standard. Cada grupo estuvo conformado de 6 animales. * $P<0.01$ con respecto al control; ** $P<0.05$ con respecto al control.

Tabla 2. Regresión logística para la probabilidad de que la maca incremente los valores de producción diaria de espermatozoides por encima de la media del grupo control.

Maca	OR±ES	P	Intervalo de Confianza al 95%
Negra	16.33±13.95	0.001	3.06-87.18
Amarilla	5.6±3.72	0.01	1.52-20.61
Roja	1.16±0.79	NS	0.31-4.40

OR: Odds ratio. ES: error Standard. Tamaño muestral=78. R2=0.18; P=0.0002

Sensibilidad: 65%

Especificidad: 81.58%

Valores positivos predictivos: 78.79%

Valores negativos predictivos: 68.89%

Clasificados correctamente: 73.08%

Área bajo la curva ROC: 0.75

Tabla 3. Regresión logística para la probabilidad de que la maca incremente los valores de conteo de espermatozoides en epidídimo por encima de la media del grupo control.

Maca	OR±ES	P	Intervalo de Confianza al 95%
Negra	8.67±6.58	0.004	1.96-38.40
Amarilla	5.50±3.91	0.017	1.36-22.22
Roja	3.33±2.19	NS	0.91-12.11

OR: Odds ratio. ES: error Standard. Tamaño muestral=78. R2=0.12; P=0.0066

Sensibilidad: 79.07%

Especificidad: 58.06%

Valores positivos predictivos: 72.34%

Valores negativos predictivos: 66.67%

Clasificados correctamente: 70.27%

Área bajo la curva ROC: 0.72

Tabla 4. Regresión logística para la probabilidad de que la maca incremente los valores de conteo de espermatozoides en conducto deferente por encima de la media del grupo control.

Maca	OR±ES	P	Intervalo de Confianza al 95%
Negra	23.33±26.07	0.005	2.61-208.61
Amarilla	10.00±8.72	0.008	1.81-55.28
Roja	9.16±8.03	0.012	1.64-51.10

OR: Odds ratio. ES: error Standard. Tamaño muestral=78. R2=0.24; P=0.0002

Sensibilidad: 80.43%

Especificidad: 75.00%

Valores positivos predictivos: 88.10%

Valores negativos predictivos: 62.50%

Clasificados correctamente: 78.79%

Área bajo la curva ROC: 0.80

ROC de 0.80, una cifra bastante buena que señala una alta tasa de discriminación de los verdaderos positivos con respecto a los falsos positivos, en este caso mayor cantidad de espermatozoides por efecto de la maca. (Tabla 4)

Diferentes respuesta biológicas en macas de diferentes lugares

Se ha analizado la procedencia del cultivo de la maca en función de su respuesta biológica. Los resultados son presentados en la Tabla 5. La mejor respuesta se observa con la maca negra ($P<0.01$) y amarilla ($P<0.05$) de Ninacaca. En relación a la maca cultivada en Carhuamayo, sólo la maca negra mostró un incremento en el conteo de espermatozoides en el conducto deferente ($P<0.01$). En Chupaca sólo la maca roja mostró incremento significativo del conteo de espermatozoides en el conducto deferente ($P<0.01$). Comparativamente el conteo de espermatozoides en conducto deferente que resulta de la administración de maca negra de Ninacaca es 1.64 veces mayor que el obtenido con maca roja. Comparado con el control, la maca negra de Ninacaca aumenta 2.48 veces el conteo de espermatozoides.

Diferentes respuesta biológicas en macas obtenidas de diferentes expendios comerciales.

De acuerdo al marcador del bio-ensayo (conteo de espermatozoides en conducto deferente luego de 3 días de tratamiento con maca) se observa que el standard de referencia (extracto acuoso de maca negra hervida y liofilizada de Ninacaca) produce un incremento significativo del conteo de espermatozoides en conducto deferente (Figura 1). En esta misma gráfica se puede observar que las otras variedades de Maca evaluadas, obtenidas comercialmente, no tienen efecto sobre esta variable.

Igualmente la maca negra de Ninacaca pulverizada y pre-tostada no tiene el efecto biológico en este bio-ensayo. La maca negra fresca pulverizada igualmente carece de efecto.

Cuando se evalúan los otros parámetros de medición como la Producción Diaria de Espermatozoides

Tabla 5. Conteo de espermatozoides en conducto deferente (millones de espermatozoides) luego de tres días de tratamiento con extracto acuoso de maca (1 gramo/Kg peso corporal).

Lugar de cultivo	Altitud (m)	Negra	Amarilla	Roja
Ninacaca	4,246	9.68±0.86*	7.13±1.64**	4.62±0.15
Carhuamayo	4,125	7.61±0.43*	5.24±0.52	5.19±0.57
Chupaca	3,846	5.98±0.92	5.93±0.80	5.89±0.16*

Datos son promedios ± error Standard. El valor del control es de 3.91±0.35 millones de espermatozoides. P<0.01; *P<0.05 con respecto al control. El número de animales por grupos es de seis.

CONTEO EN CONDUCTO DEFERENTE

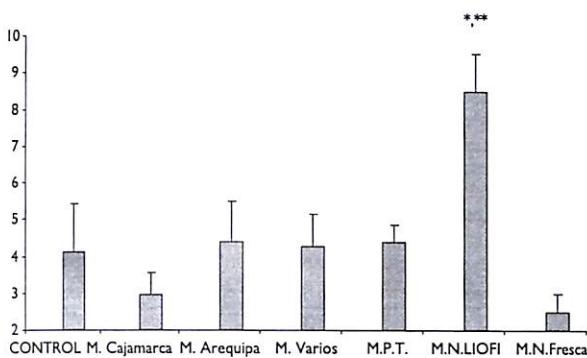


Figura 1. Conteo de espermatozoides (millones) en conducto deferente de ratas tratadas por 3 días con diferentes productos procedentes de maca. Los resultados son comparados con el control (vehículo) y el extracto acuoso hervido y liofilizado de maca negra de Ninacaca (MNLIOFI) que es el Standard de referencia en nuestro bioensayo. MN Fresca se refiere a maca negra fresca- MPT es maca negra seca pretostada.*P<0.05 con respecto al control; **P<0.01 con respecto a las otras macas.

(PDE) o el conteo de espermatozoides en epidídimo también se corrobora el efecto del extracto acuoso hervido de la maca negra y liofilizada (Standard) incrementando la PDE y el conteo de espermatozoides en epidídimo, y el nulo efecto de las diferentes formas comerciales de maca ensayadas (Figuras 2 y 3).

En la Figura 4 se muestran resultados cuando se evalúan las hojas de la maca. Se puede comprobar que al igual que con los hipocótilos, la maca negra es la que tiene efecto sobre el conteo de espermatozoides, en tanto que ello no ocurre ni con la maca morada, ni la roja ni la amarilla. Este efecto se observa con una dosis de 0.2 g/Kg, cinco veces menor que el usado para los hipocótilos (que es equivalente a 1 g maca seca/Kg). El extracto atomizado de maca negra es igualmente efectivo que el extracto acuoso liofilizado.

PRODUCCION DIARIA DE TESTICULO

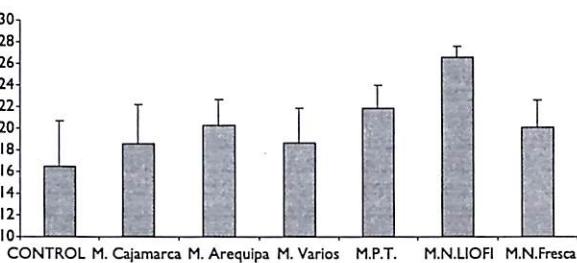
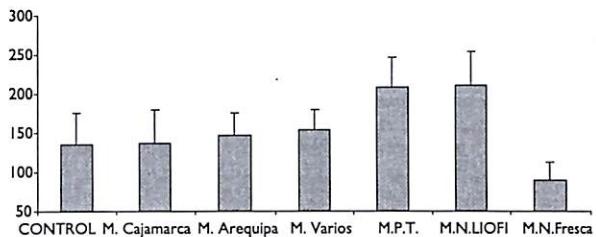


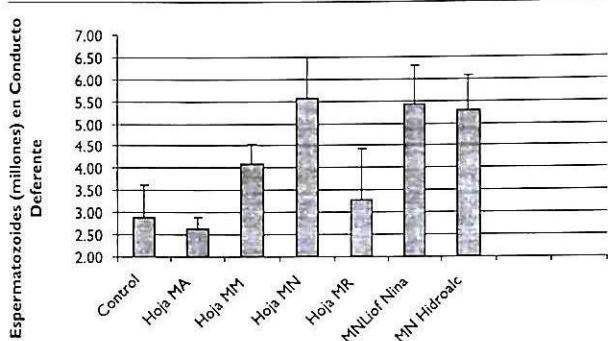
Figura 2. Producción diaria de espermatozoides en testículo (millones) de ratas tratadas por 3 días con diferentes productos procedentes de maca. Los resultados son comparados con el control (vehículo) y el extracto acuoso hervido y liofilizado de maca negra de Ninacaca (MNLIOFI) que es el Standard de referencia en nuestro bioensayo. MN Fresca se refiere a maca negra fresca- MPT es maca negra seca pretostada.*P<0.01 con respecto al control y con respecto a las otras macas.

CONTEO TOTAL EN EPIDIDIMO



M. Cajamarca: Maca en harina obtenida en Cajamarca
M. Arequipa: Maca en harina obtenida en Arequipa
M. Varios: Obtenida en Arequipa. Contiene maca, polen, kiwicha, trigo, soya, ajonjoli, cañihua y quinua.
MPT: Maca negra seca de Ninacaca molida y tostada por 5 minutos.
MN LIOF: Maca negra seca de Ninacaca, hervida y liofilizada.
MN Fresca: Maca negra fresca pulverizada

Figura 3. Conteo de espermatozoides (millones) en epidídimo de ratas tratadas por 3 días con diferentes productos procedentes de maca. Los resultados son comparados con el control (vehículo) y el extracto acuoso hervido y liofilizado de maca negra de Ninacaca (MNLIOFI) que es el Standard de referencia en nuestro bioensayo. MN Fresca se refiere a maca negra fresca- MPT es maca negra seca pretostada.*P<0.01 con respecto al grupo maca negra fresca pulverizada (M.N.HGA)



Hoja MA: Hojas Maca amarilla

Hoja MM: Hojas Maca morada

Hoja MN: Hojas Maca negra

Hoja MR: Hojas Maca roja

MN liof Nina: extracto acuoso de hipocótilos de maca negra liofilizada

MN Hidroalcoh: extracto acuoso de maca negra atomizada.

Figura 4. Conteo de espermatozoides (millones) en conducto deferente de ratas tratadas por 3 días con hojas de maca. Los resultados son comparados con el control (vehículo) y el extracto acuoso hervido y liofilizado de maca negra de Ninacaca (MNLIOF) que es el Standard de referencia en nuestro bioensayo y con extracto atomizado de maca negra de dos años. * $P<0.05$ de la hoja de maca negra, hipocótilos de maca negra liofilizada y extracto atomizado de maca negra comparado al control.

DISCUSION

Se ha creado un bio-ensayo para la identificación y control de calidad de los productos procedentes de la maca. La maca, una crucífera, que crece en zonas por encima de los 3500 metros de altitud (Valerio y Gonzales, 2005) es una planta domesticada conocida desde tiempos pre-hispánicos y que crece mayormente en los Andes centrales y que tradicionalmente se conoce por su propiedad de mejorar la fertilidad. Los estudios científicos han mostrado que la maca mejora la espermatogénesis en ratas en condiciones normales (Gonzales C y col, 2006) y patológicas (Gonzales y col, 2004). Alvarez (1993) ha demostrado un aumento en la fertilidad de los cobayos luego de suplementar su alimento con maca. En varones normales también se ha observado un incremento en el número de espermatozoides luego de 4 meses de tratamiento con maca gelatinizada (Gonzales y col, 2001).

La maca contiene varios compuestos químicos que han sido propuestos como marcadores químicos para identificarlos y tener normas de control de calidad. Entre ellos destacan el bencil

glucosinolato (Johns, 1981; Dini y col, 2002; Li y col, 2001; Piacente y col, 2002) y las macamidas (Zheng y col, 2000; McCullom y col, 2005; Zhao y col, 2005).

Los glucosinolatos son diferentes compuestos químicos predominantes de las crucíferas y que han mostrado una importante actividad anti-tumoral (Fahey y col, 2001). El bencil glucosinolato también se aprecia en la mashua (*Tropaeolum tuberosum*); sin embargo esta planta tiene un efecto inhibidor de la reproducción (Johns y col, 1982), por lo que la acción de la maca sobre el conteo de espermatozoides no sería debido a los bencil glucosinolatos, y por lo tanto no pueden ser utilizados como marcadores de dicha actividad biológica. Los glucosinolatos al ser anti-tumorales son anti-mitóticos o anti-apoptóticos; sin embargo una acción favoreciendo la espermatogénesis requiere de compuesto activos que promuevan la mitosis, por lo que se descarta el uso de bencil glucosinolatos como marcador químico de la maca

Chacón encontró un efecto temprano de la maca sobre el conteo de espermatozoides en ratas (Chacón, 1961). Esto ha sido confirmado recientemente (Gonzales y col, 2006a). Si bien es cierto que para determinar un efecto de la maca sobre la espermatogénesis requiere al menos 42 días de tratamiento (Gonzales C y col, 2006), se ha demostrado que la producción diaria de espermatozoides, el conteo de espermatozoides en epidídimo y el conteo de espermatozoides en conducto deferente pueden afectarse luego de un ciclo espermatogénico de tratamiento (12.5 días) (Aslam y col, 1999). Los resultados, sin embargo, no pueden interpretarse como un aumento en las espermatogonias y en la espermatogénesis por el poco tiempo de exposición. Tampoco puede asumirse que la espermación se ha incrementado pues dicho evento es de casi 97% en las ratas adultas normales (Saito y col, 2000) por lo que es muy difícil que la maca esté actuando sobre un proceso bastante eficiente.

Lo que se propone es que la maca está modulando la homeostasis y manteniendo los niveles de espermatozoides en el tracto reproductivo a través de un balance oxidación-antioxidación a nivel de la PDE, conteo de espermatozoides en

epidídimo y en conducto deferente (Gonzales y col, 2006a). Sandoval y col (2002) ha mostrado que la maca tiene efecto anti-oxidante.

Esta propiedad de la maca de modificar los niveles de espermatozoides en el tracto reproductivo de manera temprana es el principio que se ha utilizado para desarrollar el presente bio-ensayo. Los resultados del presente estudio han permitido demostrar que la medición del número de espermatozoides en el conducto deferente luego de 3 días de tratamiento es el mejor marcador biológico para ser usado como bio-ensayo. Esta prueba ha demostrado tener una sensibilidad de 80.43% y una especificidad de 75%. La curva ROC obtenida en la prueba de sensibilidad y especificidad con datos cuantitativos da un valor de 0.79, que implica una alta tasa de discriminación de los verdaderos positivos con respecto a los falsos positivos, en este caso mayor cantidad de espermatozoides por efecto de la maca.

Al poner en evaluación este bio-ensayo se ha podido demostrar que el mismo puede discriminar entre la actividad biológica de la maca de diferentes variedades (negra, amarilla y roja) indicando que la mejor actividad se observa con la negra, y con la amarilla una actividad de menor magnitud, en tanto que la maca roja no tiene efecto. Cuando la maca se encuentra pulverizada o en forma de harina no es posible identificar su color por lo que este bio-ensayo se convertiría en una excelente alternativa para diferenciarlas. La maca como ha sido descrita previamente se presenta en diferentes colores (Tello y col, 1992), siendo la más usada la maca amarilla (Valerio y Gonzales, 2005) y estudiadas las variedades negra, amarilla y roja (Yllescas, 1994; Gonzales C y col, 2006)

Cuando se analizan macas procedentes de diferentes localizadas se encuentra igualmente diferencias biológicas entre zonas de procedencia; así la maca negra de Ninacaca mostró el mejor efecto biológico que la de Carhuamayo (valor intermedio) y la de Chupaca (menor valor). Utilizando el bio-ensayo se puede así evaluar la calidad de la cosecha en la cual mediante una prueba corta se puede verificar la actividad biológica y permitirá hacer las correcciones pertinentes en el proceso de siembra-cosecha.

Finalmente se han evaluado macas procedentes de expendios comerciales, principalmente en mercados de diferentes lugares del país. No se ha evaluado maca procesada en formas de tabletas, pastillas o cápsulas que se expenden en diferentes centros incluidos los farmacéuticos. Las macas obtenidas en forma de polvo no mostró actividad biológica por lo que es importante que las autoridades propongan normas para el control de calidad respectivo de los productos que se expenden, pues la población que la adquiere y consume necesita estar segura que lo que está consumiendo es realmente el producto que desea.

La manera tradicional como se consume la maca requiere de un proceso de cocción y luego tomar el extracto acuoso. Es probable que los productos de maca adquiridos no tengan esta parte del proceso tradicional. Para determinar si efectivamente el proceso de hervido tiene implicancia en la actividad biológica se han estudiado las respuestas biológicas a la maca negra deshidratada de Ninacaca la cual ha sido pulverizada y pre-tostada por 5 minutos y se ha comparado con la misma maca luego de ser hervida y liofilizada el extracto acuoso. Los resultados del bio-ensayo demuestran que la maca para tener actividad biológica requiere ser hervida previo a ser consumida.

Los nativos de los Andes centrales consumen la maca luego de ser deshidratada y en tal condición lo pueden mantener por períodos prolongados. No se sabe sin embargo si la maca obtenida fresca tiene una acción similar a la deshidratada. Para tal efecto se ha obtenido maca fresca pulverizada y se ha procedido a analizarla en el bio-ensayo. Los resultados demuestran que la maca fresca pulverizada sin más procesamiento no tiene efecto en aumentar el conteo de espermatozoides en conducto deferente de la rata.

En este estudio se ha podido demostrar por primera vez el efecto del extracto acuoso de las hojas de maca sobre el conteo de espermatozoides. Una vez más se demuestra el importante efecto de la maca negra aumentando el número de espermatozoides en el conducto deferente. A la fecha existe solo un estudio en hojas de maca específicamente en un extracto

oleoso obtenido con pentano. Este extracto ha mostrado actividad fitotóxica, cianobactericida y anti-termita (Telez y col, 2002).

En resumen se ha logrado obtener un método con alta sensibilidad y especificidad que es reproducible en las diferentes oportunidades que se ensaya que implica la administración oral de maca en forma acuosa durante 3 días y la evaluación del conteo de espermatozoides en el conducto deferente y que puede ser usado para un control de calidad de los productos de maca que se expenden tanto para el consumo interno como para exportación.

REFERENCIAS

1. Alvarez CJ. Utilización de diferentes niveles de Maca en la fertilidad de cobayos. Tesis de Bachiller. Facultad de Agricultura y Zootecnia. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión: Pasco, Perú. 1993: 102
2. Aslam H, Rosiepen G, Krishnamurthy H, Arslam M, Clemen G, Nieschlag E, Weinbauer GF. The cycle duration of the seminiferous epithelium remains unaltered during GnRH antagonist-induced testicular involution in rats and monkeys. *Journal of Endocrinology* 1999; 161:281-288.
3. Cobo B. History of the new world. Biblioteca de autores españoles. 1956: 430 pp.
4. Chacon G. Estudios Fitoquímicos de *Lepidium meyenii* Walp. Tesis de Bachiller en Biología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Lima, Perú. 1961
5. Chacón G. La maca (*Lepidium peruvianum*. Sp. Nov) y su habitat. *Rev. Per. Biol.* 1990; 3:171-172
6. Chung F, Rubio J, Gonzales C, Gasco M, Gonzales GF. Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. *J Ethnopharmacol.* 2005; 98:143-7.
7. Ciska E, Martyniak-Przybyszewska B, Kozlowska H. Content of glucosinolates in cruciferous vegetables grown at the same site for two years under different climatic conditions. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 2862-2867.
8. Dalsenter PR, de Araujo SL, de Assis HC, Andrade AJM, Dallegrave E. Pré and postnatal exposure to endosulfan in Wistar rats. *Hum Expe Toxicol* 2003; 22: 171-175.
9. Dini I, Tenore GC, Dini A. Glucosinolates from Maca (*Lepidium meyenii*). *Biochem System Ecol* 2002; 30:1087-1090.
10. Fahey JW, Zalcman AT, Taladay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 2001; 56:5-51
11. Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2006;103:448-54.
12. Gonzales GF, Rubio J, Gasco M, Yucra S, Gonzales C. *Lepidium meyenii*, Maca, a plant from the highlands of Peru: Pharmacological properties and impact on production and exportation. Proceeding of the 9th International Congress on Ethnopharmacology. Nanning:China. 2006: 12-33
13. Gonzales GF, Córdova A, Gonzales C, Chung A, Vega K, Villena A. Improved sperm count after administration of *Lepidium meyenii* (Maca) in adult men. *Asian J. Androl.* 2001; 3: 301-304
14. Gonzales GF, Gasco M, Córdova A, Chung A, Rubio J, Villegas L. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m). *J. Endocrinol.* 2004; 180:87-95.
15. Gonzales GF, Nieto J, Rubio J, Gasco M. effect of Black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. *Andrologia* 2006a; 38: 166-172.
16. Johns T. The anu and the maca. *J Ethnobiol* 1981; 1:208-212.
17. Johns T, Kits WD, Newsome F, Towers GH. Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum*. *J Ethnopharmacol* 1982; 5: 149-161.
18. Kubota K, Ohsako S, Kurosawa S, Takeda K, Ping W, Sakawa M, Kawakami T, Ishimura R, Tohyama C. Effects of Vinclozolin administration on sperm production and testosterone biosynthetic pathway in adult male rat. *J Reprod Dev* 2003; 49:403-412.
19. Li G, Ammermann U, Quiros CF. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacon) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Economic Botany* 2001; 55: 255-262.
20. McCullom MM, Villinski JR, McPhail KL, Craker LE, Gafner S. Analysis of macamides in samples of maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS. *Phytochem Anal* 2005; 16: 463-469.
21. Piacente S, Carbone V, Plaza A, Zampelli A, Pizza C. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp). *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 5621-5625.
22. Rubio J, Riqueros MI, Gasco M, Yucra S, Miranda S, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced-Damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol.* 2006; 44: 1114-1122.
23. Saito K, O'Donnell L, McLachlan RI, Robertson DM. Spermiation failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats. *Endocrinology* 2000; 141: 2779-2785.
24. Sandoval M, Okuhama NN, Angeles FM, Melchor VV, Condezo LA, Iao J, Miller MJS. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry* 2002; 79: 207-213.
25. Takahashi O, Oishi S. Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol a in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 2003; 41: 1035-1044.
26. Tellez MR, Khan IA, Kobaisy M, Schrader KK, Dayan FE, Osbrink W. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp). *Phytochemistry* 2002; 61: 149-155.
27. Tello J, Hermann M, Calderon A. La maca (*Lepidium meyenii* Walp.) cultivo alimenticio potencial para las zonas andinas. *Boletín de Lima* 1992; 14: 59-66.
28. Valerio LG, Jr, Gonzales GF. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis. *Toxicol Rev* 2005; 24: 11-35.
29. Yllescas M. Chemical and physicochemical study of three ecotypes of *Lepidium meyenii* from Carhuamayo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Lima, Perú, 1994
30. Zhao J, Muhammad I, Dunbar DC, Mustafa J, Khan IA. New alkamides from Maca (*Lepidium meyenii*). *J Agric Food Chem* 2005; 53: 690-693.
31. Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Yu S, Huang ZY, Lu Y, Yan SJ, Qien LC, Zhen QY. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology* 2000; 55:598-602.

Correspondencia: ggr@upch.edu.pe

Recibido: 08 de abril de 2008
Aceptado: 04 de junio de 2008