

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E.A.P. DE MEDICINA HUMANA

Efecto protector del extracto alcaloidal de *Lepidium meyenii* ecotipo amarillo sobre la osteoporosis en ratas ovariectomizadas

TESIS

Para optar el Título Profesional de Médico Cirujano

AUTOR

Ana Cecilia Cubas Mendoza Sánchez

ASESOR

Nancy Joaquina Rojas Morán
Juan Carlos Alberto Zavala Gonzales

Lima - Perú

2017

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue financiado con el apoyo del Vice Rectorado de Investigación-UNMSM, código N°140102321, con asignación a la investigación y con incentivo al investigador (CON-CON).

A la invaluable e inagotable colaboración de la Dra. Nancy Rojas Morán, que me permitió ampliar mis conocimientos y aptitudes mediante la ayudantía en el Laboratorio del Instituto de Patología.

Al Md. Juan Carlos Alberto Zavala Gonzales, por su valioso aporte.

A la Dra. Gloria Chacón de Popovici su donación de tubérculos de *Lepidium meyenii* (*Lepidium peruvianun Chacon*), ecotipo amarillo y brindarnos material bibliográfico.

A los egresados: Janet Jáuregui Damián, Miguel Tang Yerbi, Jazmín Zárate Lizarzaburu por su colaboración en el proceso de ovariectomización y cuidados de los especímenes. A la Md. Martha Pamela Zuñiga Veira por su instrucción.

Al Dr. Julio César Santiago Contreras y al Quím. Yuri Flores Valdeón del Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Química UNMSM por su colaboración con la preparación del extracto.

Al Laboratorio de Análisis Clínico del Instituto de Investigaciones de la UNMSM del Hospital Nacional 2 de Mayo

Laboratorio Clínico del Hospital Nacional 2 de Mayo y al Dr. Sergio Gerardo Ronceros Medrano por las determinaciones bioquímicas.

Al Servicio de Radiología del HNAL y su personal técnico por la realización de la densitometría.

A la Blga. Elizabeth Neira por su apoyo con la histomorfometría

Al Blgo..César Carvallo Muguerza por su colaboración con la parte estadística.

Al Tec. Alejandro Sonco y el Sr. Reynaldo Madrid, por su colaboración con el manejo de los animales de experimentación.

A todas las personas que proporcionaron ayuda durante la realización y a hacer factible esta investigación.

A Dios, que me cuidó desde antes de nacer; a mi padre y abuelos, fuentes inagotables de saber; a mi inseparable hermano Julio. A mi amado compañero Jorge, a la niña de mis ojos, Sofía; a la gran persona de la Dra. Nancy Rojas y a todos quienes día a día se esfuerzan por salir adelante con dignidad.

INDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

	PÁGINA
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ENUNCIADO DEL PROBLEMA CIENTÍFICO.....	7
III. HIPÓTESIS.....	7
IV. OBJETIVOS.....	7
4.1 OBJETIVO GENERAL	
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
V. METODOLOGÍA.....	9
5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO.....	9
5.2 VARIABLES.....	9
5.3 MATERIALES	12
5.4 MÉTODOS.....	14
5.4.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	14
5.4.2 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	15
5.4.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	15
VI. RESULTADOS.....	22
VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
VIII. CONCLUSIONES.....	46
IX. RECOMENDACIONES.....	47
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
XI. ANEXOS.....	55

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Operacionalización de variables	10
Cuadro 2. Reacciones para verificar la presencia de alcaloides en el extracto del ecotipo amarillo de <i>Lepidiummeyerii</i>	17
Cuadro 3. Distribución de grupos y dosis respectivas	18
Cuadro 4. Valores del peso corporal inicial, final del útero y de la proteína C reactiva para los diferentes grupos de tratamiento.	26
Cuadro 5. Valores de la densitometría ósea	31
Cuadro 6. Valores de concentración de la fosfatasa alcalina del péptido N-terminal del colágeno tipo I, de la osteocalcina y del estradiol	32
Cuadro 7. Valores de la concentración de calcio y fósforo en los animales de investigación por grupo de tratamiento.	35
Cuadro 7. Valores del grosor de las trabéculas del fémur y la segunda vértebra lumbar.	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Flujograma de la fase experimental	8
Figura 2. Preparación harina de maca	53
Figura 3. Maceración metanólica en la parte inferior	53
Figura 4 Filtración metanólica en la parte inferior	53
Figura 5. Concentración metanólica en la parte inferior	53
Figura 6-8. 1er, 2do y 3er lavado de concentrado metanólico	53
Figura 9. Solución de hexano	53
Figura 10- 12. 1er, 2do y 3er extracto	54
Figura.13 Demostración de la presencia de alcaloides mediante diversos reactivos en el extracto	54
Figura 14. Cromatografía en capa fina	23
Figura 15. . Revelado con solución de Dragendorff- solución de ioduro de potasio	24
Figura 16. Revelado con reactivo de Wagner.	25
Figura 17. Promedio de los pesos corporales iniciales y finales	27
Figura 18. Comparación macroscópica entre útero del grupo sham vs control.	28
Figura 19. Peso de los úteros de los animales sometidos a los diferentes tratamientos	28
Figura 20. Citología del epitelio vaginal de ratas ovariectomizadas vs sham	29

Figura 21. Citología del epitelio vaginal de ratas después del tratamiento	30
Figura 22. Densitometría ósea de la columna y del fémur de los animales de investigación por grupo de tratamiento	31
Figura 23: Concentración de la fosfatasa alcalina por grupo de tratamiento.	33
Figura 24: Concentración de la osteocalcina por grupo de tratamiento	33
Figura 25 Concentración del péptido N-terminal del colágeno tipo I por grupo de tratamiento.	34
Figura 26: Concentración del estradiol por grupo de tratamiento.	35
Figura 26: Concentración del Calcio y Fósforo por grupo de tratamiento.	34
Figura N° 25:	33
Figura N° 26: Grosor de las trabéculas óseas del fémur y de la segunda vértebra lumbar de los animales de investigación por grupo de tratamiento.	34
Figura 27. Histología del cuerpo de la segunda vértebra lumbar	35
Figura 28. Histología del cuerpo de la segunda vértebra lumbar	36

RESUMEN

Introducción: La osteoporosis es un trastorno del metabolismo óseo que predispone a fracturas con una alta carga de morbilidad asociada. Otros autores han comprobado experimentalmente la propiedad antiresortiva del extracto etanólico de los ecotipos rojo y negro de *Lepidium meyenii*, “maca”, el cual incluye diversos metabolitos. Por ello, hace falta estudios que determinen el efecto de la fracción alcaloidal en la osteoporosis. **Objetivo:** Demostrar el efecto protector del extracto alcaloidal de *Lepidium meyenii* ecotipo amarillo sobre la osteoporosis inducida en ratas ovariectomizadas. **Diseño:** analítico, experimental incompleto. **Participantes:** 50 ratas. **Lugar:** Instituto de Patología de UNMSM, 2015. **Método:** división aleatoria en 5 grupos de 10 cada uno: operación simulada (sham) y ovariectomizadas con tratamiento: estradiol (40µg/Kg), extracto alcaloidal (EA) a dosis de 75mg/k y 100mg/k (maca I y II respectivamente), y sin tratamiento protector. Dosis diarias vía orogástrica por 8 semanas. Posteriormente se determinó densidad mineral ósea (DMO), marcadores óseos: fosfatasa alcalina (FA), osteocalcina, telopéptido amino terminal del colágeno (NTX), estradiol, calcio y fósforo en suero; y histomorfometría. **Resultados:** No se evidenciaron cambios significativos en la densitometría vertebral, a nivel del fémur se evidenció disminución en el grupo maca II. La FA ($141,90 \pm 33,58$ UI/L) y la osteocalcina ($38,578 \pm 10,403$ ng/ml) mostraron niveles superiores no significativos, el nivel de estradiol con el grupo maca II fue superior no significativo. Los niveles de calcio y fósforo no mostraron variación. En la histomorfometría el grupo maca II ($58,030 \pm 4683$) mostró mayor grosor trabecular significativamente. **Conclusiones:** se evidenció efecto protector antiresortivo parcial en los cambios inducidos por la ovariectomización, sin embargo, no se indujo osteoporosis al no encontrarse variación en los niveles de DMO.

PALABRAS CLAVE: Osteoporosis, ovariectomía, *Lepidium*, maca, extracto, alcaloide, densidad ósea, estructura ósea.

SUMMARY

Introduction: Osteoporosis is a bone metabolism disorder which predispose to fractures with a high charge of associated morbidity. Other authors have ascertained the antiresorptive properties of the ethanolic extract of *Lepidium meyenii* (maca) ecotypes red and black, which include several metabolites. For that reason, there is a need of studies to determine the effect of the alkaloid in osteoporosis. **Objective:** To demonstrate the protector effect of the alkaloid extract of *Lepidium meyenii* yellow ecotype over the induced osteoporosis in ovariectomized rats. **Design:** Analytical, experimental and incomplete. **Participants:** 50 rats. **Location:** Institute of Pathology UNMSM, 2015. **Method:** Randomized division in 5 groups of 10 each one. Operation simulated group (Sham) and ovariectomized with treatment estradiol (40µg/Kg), alkaloid extract (EA) doses of 75mg/Kg and 100mg/Kg (maca I and II respectively), and without protector treatment. Daily doses via oral gastric for 8 weeks. Later, bone density was determined (DMO), bone markers: alkaline phosphatase (FA), osteocalcin, amine terminal collagen telopeptide (NTX), estradiol, calcium and phosphate in serum and hystomorphometry by measuring of trabecular thickness. **Results:** There were no evidence of significate change in vertebral densitometry, at the level of femur reduction in group maca II was evidenced. The FA (141,90 ± 33,58 UI/L) and the osteocalcin (38,578 ± 10,403ng/mL) showed higher levels no significant, at the level of calcium and phosphate no variation were seen. In hystomorphometry, group maca II (58,030 ± 4683) showed major trabecular thickness significantly. **Conclusions:** It was evidenced the antiresorptive protector effect in changes induced by the means of ovariectomization, nevertheless, osteoporosis was not induced, and as variations in DMO levels were not found.

Key words: Osteoporosis, ovarectomy, *Lepidium*, maca, extract, alkaloid, bone density, bone structure.

I. INTRODUCCIÓN

La **osteoporosis** es un problema de salud pública a nivel mundial debido al envejecimiento progresivo de la población, afectando a más de 200 millones de personas, y se calcula que entre 30-50 % de las mujeres postmenopáusicas desarrollarán la enfermedad (1). La prevalencia aumenta desde el 15% para las edades comprendidas entre 50 y 59 años, hasta mayor al 80% en edades superiores a 80 años (2).

Esta enfermedad esquelética de orden multifactorial (3), según la Organización mundial de la salud (OMS), se caracteriza por la atrofia del tejido óseo donde disminuye el espesor del hueso cortical, el número y espesor del hueso trabecular o esponjoso lo que aumenta el espacio ocupado por la médula ósea. El hueso es menos resistente al stress mecánico y lo hace más frágil, lo que aumenta el riesgo a la fractura como principal complicación (3,4). De manera que toda definición moderna debe incluir tres elementos: disminución de la masa ósea, deterioro de la micro arquitectura e incremento del riesgo de fracturas por fragilidad (3). Ocurriéndose predominantemente nivel vertebral y en la extremidad distal de radio (colles) (3,5). La frecuencia de este tipo de fracturas aumenta de 9,5 por cada 1000 habitantes antes de la menopausia, a 17,2 por cada 1000 ciudadanos después de la menopausia (6), con el consecuente aumento de la morbimortalidad asociada.

Dentro de la clasificación de esta enfermedad se tiene especial énfasis en la **osteoporosis tipo I o postmenopáusica**, de mayor prevalencia, caracterizado por una pérdida acelerada y desproporcionada de hueso trabecular (alta remodelación ósea) entre los 45-75 años (6), cuyo principal mecanismo se explica por la disminución en el estímulo estrogénico en los receptores de las células óseas, con predominio de la resorción por medio de la inhibición de la proliferación y diferenciación de los precursores osteoblásticos, reduciendo la supervivencia de los osteoblastos maduros,

promoviendo su apoptosis (7). También permite la supervivencia de los osteoclastos por medio del aumento de la expresión del ligando del receptor activador del factor nuclear- κ B (RANKL) por los osteoblastos (7,8). Se incrementa la expresión de citosinas pro inflamatorias como: IL-1, IL-6, IL-11, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), unidades formadoras de colonias de granulocitos-monocitos (GM-UFC) y prostaglandina E₂ (PGE₂), las cuales aumentan la síntesis y maduración de osteoclastos (9). Esto conlleva a una pérdida de 20-30% de masa ósea trabecular y 5-10% de masa ósea cortical que en los primeros 3-4 años es del 2.5% anual, la cual desciende a 0.75% en adelante (8). El remodelado óseo también se puede modular a través de mecanismos indirectos como el calcitriol o la paratormona (6). La osteoprotegerina (OPG) es una citoquina reguladora negativa de osteoclastogénesis activada por el RANKL, producida por los osteoblastos y en gran parte por los **linfocitos B**, los cuales despliegan un importante rol como reguladores activos del eje **RANK/RANKL/OPG** (8,9). En condiciones de inflamación, las cuales se dan en los estados postmenopausicos (10), linfocitos B activan el RANKL en mayor proporción a los osteoblastos y por ende la osteoclastogénesis mediante la coestimulación de los linfocitos CD40 (6,10).

La resistencia ósea, no solo está determinada por la densidad (cantidad de hueso), sino también intervienen otros factores que mide la calidad ósea, como la micro arquitectura (tamaño, forma cortical y trabecular del hueso, el entramado de las conexiones, la morfología y grosor de las trabéculas), el remodelado óseo, el grado de mineralización, el daño acumulado (micro fracturas) y las propiedades del colágeno y la matriz ósea (6). Sin embargo, en la práctica clínica todos estos factores son difíciles de objetivar mediante métodos asequibles por lo que se cuenta como prueba diagnóstica la medición de la **densidad mineral ósea** (DMO) mediante el uso de la absorciometría de rayos X de energía dual (DXA). La valoración del T-score permite la toma de decisiones terapéuticas y la monitorización del tratamiento a largo plazo (6,2). No obstante, se dispone además, de otras

pruebas que complementan su información, como los **marcadores de remodelado óseo**, que permiten dar información sobre aspectos relacionados con la calidad del hueso y son empleados en el seguimiento a corto plazo en la terapia antiosteoporótica (11). Entre los más reconocidos de formación ósea se tiene la osteocalcina y la fosfatasa alcalina hueso específica (BSAP), siendo el segundo de mayor especificidad, medible en suero y sus niveles no se alteran con la dieta (11,6). Los de resorción ósea son diversos, entre ellos se tiene a los obtenidos a partir del suero como la fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP); los que se miden en el suero y orina como los telopéptidos aminoterminal del colágeno tipo I (NTX) y telopéptidos carboxilo terminal del colágeno tipo I (CTX) -recomendado para el seguimiento clínico; y aquellos obtenidos solamente en la orina como la hidroxiprolina y la desoxipiridinolina, esta última más específica, cuyas concentraciones tampoco se afectan con la dieta (11,12).

La primera línea de **tratamiento en osteoporosis** la constituyen los bifosfonatos con alta afinidad ósea y potencia antiresortiva, tiene efectos adversos como la intolerancia gastrointestinal (6,13), como otra alternativa se tiene a los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) que disminuyen el riesgo de fracturas vertebrales e incrementan la DMO, aunque su uso aumenta el riesgo de trombosis venosa profunda, en semejanza a la terapia de remplazo hormonal (TRH) con estrógenos quienes disminuyen la resorción ósea y aumentan la DMO pero se asocian al aumento en el riesgo de padecer cáncer de mama, enfermedades coronaria, enfermedad cerebrovascular y otros eventos tromboembólicos (3,13). Por otra parte, la calcitonina tiene relativa actividad sobre la densidad mineral ósea y débil eficacia contra las fracturas, además se ha relacionado su uso intranasal con la aparición de tumores por lo que la Food and Drug Administration (FDA) ha eliminado su uso (3,6). Para contrarrestar estos efectos adversos se emplean medidas preventivas primarias como la dieta y la actividad física enfocadas en mejorar la calidad de vida y disminuir el impacto socioeconómico (6,13). Se cuentan además con terapias

alternativas entre ellas la fitoterapia, que evitan estos efectos adversos (14).

Existe un creciente interés en la utilización de productos de origen natural; por ello, la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece en su estrategia sobre la Medicina Tradicional 2014-2023 aumentar la base de evidencia haciendo énfasis su aislamiento y estudio de los componentes que se emplean de manera ancestral mediante el acceso a la población de manera segura, respetuosa, asequible y efectiva. (14). De nuestro herbario andino se emplea desde la época preincaica la raíz tuberosa de *Lepidium meyenii* (maca) (15,16), cuyas propiedades se encuentran relacionadas con mejoras en la función sexual y reproductiva, la memoria, ansiedad y depresión, como energizante, reduciendo la hiperplasia prostática y osteoporosis inducida experimentalmente (16).

La **maca** pertenece a la familia Brassicaceae y crece en los andes centrales del Perú por encima de los 4000 metros de altitud, donde se cultiva hace más de 2000 años y se han descrito 5 variedades (roja, negra, blanca, morada y amarilla) (16), siendo el color amarillo más consumido y comercializado por los campesinos (15). Este nutraceutico no ejerce efecto tóxico a dosis usuales, que en los nativos andinos equivalen a 1.4 g/kg (17). Su dosis letal media (DL50) supera los 15g/Kg de extracto acuoso en ratones por vía oral e intraperitoneal (18).

El efecto de la **ovariectomía** en el metabolismo óseo en ratas ha sido probado como un buen modelo para la osteoporosis en la que es posible medir la densidad mineral ósea (19). Donde el mayor compromiso de resorción ósea a corto plazo se da en las zonas de hueso trabecular o esponjoso de las vértebras lumbares y el fémur. (20,21).

Zhang y col. (22) realizaron un estudio experimental en ratas ovariectomizadas tratadas con extracto etanólico de maca a dosis orales de 0,096 y 0,24 g de extracto/Kg de peso corporal durante 28 semanas y se encontró que la mayor dosis prevenía la pérdida ósea en parámetros de

DMO, histopatológicos y bioquímicos. **Gonzales y col.** (23) investigaron el efecto del extracto hidroalcohólico de las tres variedades conocidas: amarilla, roja y negra sobre la estructura ósea en ratas ovariectomizadas. Determinando que tanto la maca roja como la negra, pero no la amarilla, tienen efecto sobre la osteoporosis similar al estradiol (23). Ninguno de los tratamientos con las tres variedades de maca, a diferencia del estradiol, incrementa el peso uterino, lo que sugiere un efecto no dependiente de estrógeno; similar a lo reportado por el mismo autor (23,24).

La maca presenta en su composición química metabolitos primarios; como carbohidratos (55 a 60%), proteínas (10 a 12%), fibra (8 a 9%) y lípidos (2 a 3%) (25). Y metabolitos secundarios; como el ácido linolénico y otros ácidos grasos polinsaturados (macaenos) y sus correspondientes macamidas (formadas al reaccionar con un grupo amida), glucosinolatos, alcaloides denominados comúnmente macainas, esteroides, ácidos grasos insaturados, polifenoles, y un alto contenido de aminoácidos esenciales, también presenta minerales (gran contenido porcentual de calcio (207.9mg%) y fósforo (328.10 mg%) y otros metabolitos (26,27,28). Los alcaloides imidazólicos de la maca se denominan lepidilinas de las que se conocía A y B: cloruro de 1,3-dibenzil-4,5-dimetilimidazolio y cloruro de 1,3-dibenzil-2,4,5-trimetilimidazolio respectivamente) (25,29), recientemente se identificaron las fracciones lepidilina C y D (cloruro de 3-benzil-1-(3-metoxibenzil)4,5-dimetilimidazolio y cloruro de 3-benzi-1-(3-metoxibenzil)-2,4,5 trimetilimidazolium respectivamente) (30).

Los extractos hidroalcohólicos utilizados por Zhang y Gonzales (22, 23) contienen metabolitos secundarios como esteroides, flavonoides, ácidos grasos, vitaminas y alcaloides. En este tipo de extracto es difícil determinar un agente específico y por tanto un posible mecanismo de acción que explique sus propiedades biológicas.

La **fracción alcaloidal**, derivada de aminoácidos, tiene gran importancia económica porque son biológicamente activos y ejercen actividad

farmacológica (18) Se conoce el efecto antiosteoporótico de otros alcaloides como la berberina (alcaloide isoquinolinico aislado de *Hydratis canadensis L.* y *Arcagelisia flora*) en el modelo inducido para osteoporosis senil en ratones (31). Así como los efectos antiresortivos del alcaloide norzoanthamina, aislada del organismo marino *Zoanthusgenus*, que inhibe la interleucina-6, mediador de la resorción ósea (32).

Existe mucho interés en el campo científico por conocer si el consumo de la maca puede promover el incremento positivo en el estado de salud de un individuo que padece enfermedades crónicas como la osteoporosis, la búsqueda de los principio activos en las raíces de *Lepidium meyenii Walp* que permitan frenar, prevenir, contrarrestar el progreso de esta enfermedad ha sido objeto de dos estudios (Zhang,Gonzales,) En la revisión de las propiedades biológicas de la maca realizado por Gonzales y col. (16) sugieren realizar investigaciones con la fracción alcaloidal para conocer su actividad biológica y posible toxicidad.

Por lo expuesto, el presente estudio busca evaluar el efecto antiosteoporótico del extracto alcaloidal del ecotipo amarillo, variedad con mayor producción agrícola (80 %) y consumo humano (19).

II. ENUNCIADO DEL PROBLEMA CIENTÍFICO

¿Tiene el extracto alcaloidal de *Lepidium meyenii* ecotipo amarillo un efecto protector sobre la osteoporosis en ratas ovariectomizadas?

III. HIPÓTESIS

El extracto alcaloidal de *Lepidium meyenii* ecotipo amarillo tiene efecto protector sobre la osteoporosis inducida por ovariectomización en ratas hembras Sprague Dawley.

IV. OBJETIVOS

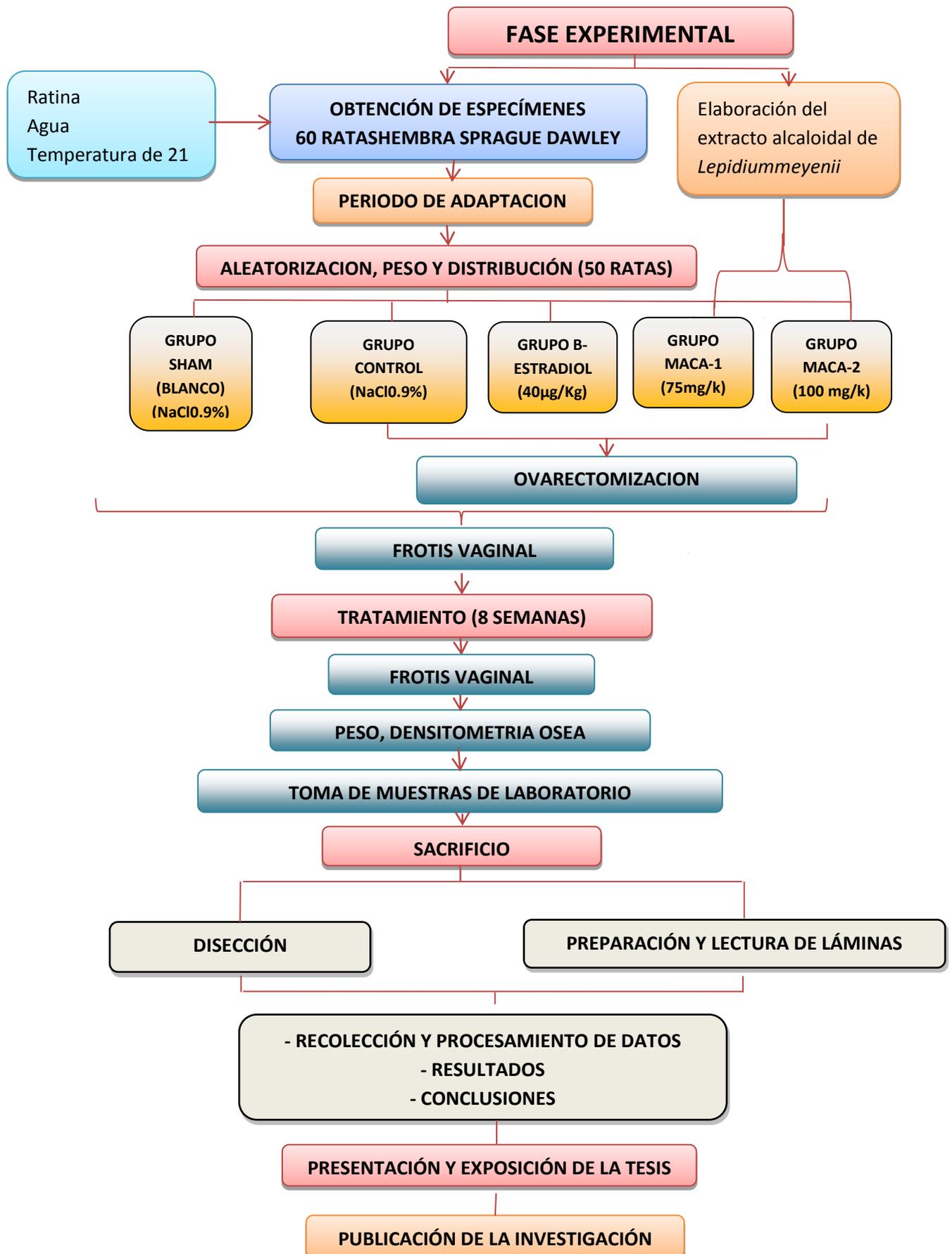
4.1 Objetivo general

Demostrar el efecto protector del extracto alcaloidal de *Lepidium meyenii* ecotipo amarillo sobre la osteoporosis inducida en ratas ovariectomizadas.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar el grado de mineralización del hueso después del tratamiento mediante el examen de densitometría mineral ósea.
- Determinar los cambios en la arquitectura del tejido óseo trabecular mediante estudio histomorfométrico.
- Demostrar la variación de los marcadores bioquímicos de resorción y formación ósea en las ratas después del experimento.

Figura N° 1. Flujograma de la fase experimental



V. METODOLOGÍA

5.1 Diseño del estudio

Estudio analítico, aleatorizado y experimental incompleto, realizado en el año 2015 en el Instituto de Patología de la Facultad de Medicina de San Fernando de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

5.2 Variables

Variable independiente:

Solución de extracto alcaloidal de *Lepidium meyenii*, ecotipo amarillo.

Variable dependiente:

Osteoporosis

Cuadro N° 1 .Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensión	Tipo	Escala	Instrumento	Forma de medición	Indicador
Extracto alcaloidal de <i>Lepidium meyenii</i> Walp. Ecotipo amarillo	Producto de consistencia semisólida obtenido por extracción ácido básica con n-hexano y cloroformo a partir de harina de maca, ecotipo amarillo.	Dilución de la fase semisólida del extracto con solución surfactante hidrofílico (twin 80) y agua bidestilada	Fitoquímica	Cuantitativa continua	Razón	Balanza analítica	Directa	Valores numéricos expresados en miligramos por kilogramo (mg/Kg)

Cuadro 1 .Operacionalización de variables (continuación)

Variable	Definición conceptual	Dimensión	Definición operacional	Tipo	Escala	Instrumento	Forma de medición	Indicador
Osteoporosis	Disminución de la masa ósea y alteraciones de la microarquitectura del tejido óseo, que incrementa la fragilidad y riesgo de fractura	Densidad mineral ósea	Cantidad de mineral óseo por cm ²	Cuantitativa continua	Razón	Densitometro	Directa	Cantidad de mineral depositado por unidad de área en los huesos expresado en cm ²
		Histomorfometría ósea	Grosor de trabéculas óseas del hueso trabecular del cuerpo vertebral lumbar y epífis de femur			Microscopía óptica		Grosor de matriz ósea orgánica de las trabéculas expresada en micras (um)
		Marcadores bioquímicos de remodelado óseo	Niveles séricos de fosfatasa alcalina, osteocalcina, telopéptidosaminoterminales del colágeno (NTX), estradiol, Ca, P			Equipos y reactivos de laboratorio para análisis de sangre		Cantidad de sustancias del metabolismo óseo en la sangre por unidad de suero, expresada en nmol/ml, pg/ml, mg/dl, mg/dl respectivamente

5.3 Materiales

Material biológico

El estudio se realizó con 50 ratas hembra albina de la especie *Ratus norvegicus* de la variedad Sprague Dawley (SD) de 12-14 semanas, con peso promedio de 200-250 g procedentes del laboratorio de Fisiología Comparada de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) “Abraham Vaisberg Wolach” Universidad Cayetano Heredia (UPCH), Lima-Perú, (Ver Anexo 1).

Los especímenes se mantuvieron cada uno en una jaula a temperatura ambiental de 22 ± 2 °C, con uso de calefactor durante los meses de invierno y ciclo luz/oscuridad de doce horas. Se les alimentó con dieta balanceada (ratina[®]) adquirida de la Universidad Agraria de la Molina (UNALM), y agua ad libitum durante todo el experimento (22,23).

Equipos de laboratorio

- Mesa de disección
- Equipo de disección
- Calefactor eléctrico halógeno 800W (barras de cuarzo) Recco[®]
- Rotaevaporador Boeco[®] RV0 400 SD
- Microscopio Nikon Eclipse E 200 LED
- Cámara digital NikonSight DS-Fei
- Equipo de absorciometría dual de rayos X marca HOLOGIC[®], modelo Discovery Wi, versión 2000 Plus del Instituto de Radiología “Oscar Soto A.”(Departamento de Rayos X) del Hospital Arzobispo Loayza.

Material de laboratorio

- Jaulas metálicas para roedores de 30 x 20 x 15 cm³ de acero galvanizado
- Sondas orogástricas para rata
- Pipeta Pasteur (0.2ml)
- Embudo Buchner
- Papel filtro N° 40

Material farmacológico y reactivos

- Solución de valerato de estradiol
- Ketaminaclorhidrato (Ket-A-100® - Agrovvet Market)
- Xilazina clorhidrato (Dormi-Xyl® 2 - AgrovvetMarket)
- Benzilpenicilina procaínica/sulfato e dihidroestreptomicina (200 000 UI/ 200 mg) (Pen DuaStrep ®- Alfasan)
- Fijador spray M-FIX ® 1.03981.0102 para citodiagnóstico
- Batería coloración Papanicolau
- Batería coloración hematoxilina-eosina
- Suero fisiológico NaCl 0.9%
- Twin 80 (surfactante hidrofílico)
- Solución antiséptica yodada 10% (Yovisol ®)
- Eter dietílico
- Parafina
- Formol neutro
- Agua bidestilada

Materia prima vegetal

Los tubérculos (hipocótilo) de *Lepidium meyenii*, ecotipo amarillo, provenientes del centro poblado rural de Quilcachaca (Jorge Chavez), 4130 msnm, del Distrito de Carhuamayo, en la provincia Junín, departamento Junín. Proporcionados por la Dra. Blga. Gloria Chacón de Popovici.

Material fitoquímico

Extracto alcaloidal del tubérculo de *Lepidium meyenii* ecotipo amarillo cuya elaboración se realizó en las instalaciones del laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Química de la UNMSM.

5.4 Métodos

Análisis estadístico

Los datos se presentarán como media \pm S.D. utilizando el programa SPSS versión 12.0. Los valores p menores que 0.05 serán considerados satisfactoriamente significantes. Para el análisis de los datos obtenidos en la densitometría ósea se utilizó la prueba de t-student, mientras que para el procesamiento de datos encontrados en la histomorfometría el análisis de varianza (ANOVA).

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la distribución normal de los datos, luego se aplicó la prueba de Levene para determinar si las varianzas son homogéneas para las variables estudiadas. Para las variables cuyas varianzas fueron homogéneas se utilizó directamente el ANOVA y la prueba post hoc de Tukey, si las variables en estudio presentaron varianzas heterogéneas el ANOVA fue acompañado del estadístico post hoc C de Dunnet ya que es el más conservador y parecido a la prueba de Tukey que sólo modifica los grados de libertad, de esta forma nos aseguramos que la tasa de error estadístico sea controlada con mayor eficacia. Los datos son mostrados como media \pm la desviación estándar.

Consideraciones éticas

Los animales de experimentación fueron mantenidos en condiciones ambientales requeridas para este tipo de investigación, siguiendo los Principios Internacionales para la Investigación Biomédica del Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en sus consideraciones para aminorar el estrés, dolor, y los cuidados asociados a la cirugía (33 ,34). Se actuó bajo el marco la Ley de protección a los animales domésticos y silvestres mantenidos en cautiverio (35) manteniendo los principios, descritos por Russel y Burch de reemplazar, reducir y refinar. Para el sacrificio de los especímenes se siguieron los lineamientos de la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA) (36).

5.5 Fase experimental

Elaboración del extracto alcaloide de *Lepidium meyenii*

Desecación del material botánico: Se emplearon los tubérculos de *Lepidium meyenii*, ecotipo amarillo, 20 Kg en total, en dos preparaciones, la primera de 12 kg y la segunda con 8 Kg. Se lavaron los tubérculos con una solución diluida de lejía, se cortaron en láminas y fueron desecadas en una estufa, entre 37 y 40°C durante 72 horas. Luego se procedió a la molienda y tamizado, hasta obtener un polvo fino que fue conservado en un recipiente plástico sellados herméticamente, hasta antes de su uso para la preparación del extracto alcaloidal (Ver anexo 2, Fig. 2).

Extracción: A continuación 5 Kg de harina de maca se maceraron en 10 L de metanol químicamente puro por 10 días aproximadamente, mezclando diariamente durante 5 minutos (Anexo 2, fig.3-5).

Luego de la maceración se filtró al vacío usando el embudo Buchner y papel filtro N° 40 (Anexo 2, fig.3). El extracto metanolico filtrado se concentró en un

rotaevaporador (Boeco® RV0 400 SD) hasta obtener un cuarto del volumen total (Anexo 2, fig. 5).

Se trasvasó el extracto a un vaso de precipitado de 500 ml y se acidificó con HCl 10 % hasta obtener pH 5. Luego en una pera de decantación se realizó tres extracciones (lavados) con hexano (primer lavado con 300ml, el segundo y tercer lavado con 100 ml) (Anexo 3, fig.6-8). Se agitó fuertemente un par de minutos para mezclar y hacer una buena extracción de sustancias que tengan afinidad con el hexano. Luego se dejó reposar hasta hacer una buena separación de las fases, se descartó la fase orgánica en la parte superior (Anexo 2, fig.9) y se mantuvo la solución metanólica en la parte inferior.

A la solución metanólica se agrega aproximadamente 90 mL de hidróxido de amonio concentrado hasta obtener pH 9-10. Luego en una pera de decantación se realizó la extracción del alcaloide, realizándose tres extracciones sucesivas con cloroformo (primera extracción con 300 ml segunda y tercera con 200 ml). Se agitó fuertemente y se dejó separar la fase clorofómica que contiene los compuestos de alcaloide. Por último, se concentró en el rotaevaporador para eliminar todo el cloroformo, quedando en masa melosa de color marrón oscuro (Anexo 2, fig. 10-12).

En este proceso se obtuvieron 2.8 g de extracto alcaloidal por Kg de maca pulverizada.

Detección de alcaloides: Se realizaron pruebas cualitativas para verificar la presencia de alcaloides como la Dragendorf, Wagner y Mayer (Cuadro 2, anexo 2, fig.13). Para identificar la presencia de alcaloides presentes en el extracto se realizó cromatografía en capa fina (marcha fitoquímica) y circular (papel Watman).

Cuadro N° 2. Reacciones para verificar la presencia de alcaloides en el extracto del ecotipo amarillo de *Lepidium meyenii*

Reacciones de coloración y precipitación del extracto alcaloidal de <i>Lepidium meyenii</i> Maca. Reactivos	Resultados
Reacción de Dragendorff	Precipitado naranja oscuro abundante: Presencia de alcaloides.
Reaccion de Wagner	Precipitado marrón o café abundante: Presencia de alcaloides
Reacción de Mayer	Precipitado amarillo claro abundante: Presencia de alcaloides

Periodo de adaptación de los animales de experimentación

Una vez adquiridas, las ratas fueron colocadas en jaulas individuales, alimentadas con comida balanceada (ratina ®) y agua *ad libitum* durante dos semanas hasta ser operadas.

Aleatorización

Se llevó a cabo una aleatorización simple mediante tabla de números aleatorios. Se distribuyeron las ratas de la siguiente manera: De los 50 especímenes, 40 fueron ovariectomizadas y 10 sometidas solo a la exposición del estrés operatorio (sham), las cuales recibieron suero fisiológico (NaCl 0.9%) por vía orogástrica (OG) durante la fase experimental.

Las ratas ovariectomizadas se distribuyeron en cuatro grupos de 10 cada uno los cuales se designaron como grupo control, el cual simuló los efectos de la osteoporosis sin recibir tratamiento protector, solamente suero fisiológico vía OG. El siguiente grupo recibió B-estradiol (40µg/Kg), los otros dos grupos recibieron extracto alcaloidal a dosis de 75mg/k y 100mg/k respectivamente. Los animales recibieron el tratamiento respectivo de forma ininterrumpida durante 8 semanas después de tres meses de ser ovariectomizadas. (Cuadro 3).

Cuadro N° 3. Distribución de grupos y dosis respectivas.

Grupo	Categoría	Técnica	Tratamiento	Via adm.	Dosis
G-1	Blanco	Sham	NaCl 9%	Oral	1 ml
G-2	Control	ovarectomización	NaCl 9%	Oral	1ml
G-3	Experimento	ovarectomización	estradiol	Oral	40 ug/Kg
G-4	Experimento	ovarectomización	Extracto alcaloide	Oral	75mg/k
G-5	Experimento	ovarectomización	Extracto alcaloide	oral	100mg/k

Una vez situados cada espécimen en su jaula se designó un número arábigo colocado con el antisépticovioleta de metilo (violeta de genciana) en la cola, el mismo número se encontraba en una parte visible de la base de la jaula para su correcta identificación.

Técnica de Ovariectomía (OVX) en ratas albinas

Se designó aleatoriamente 40 ratas para la Ovariectomía. Tuvieron un periodo previo de ayuno de 8 horas, fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con ketamina 40mg/kg y 10g/kg de xilazina (37), con inicio del efecto sedante aproximadamente a los 10 minutos el cual se mantuvo de 1-2 horas. Se realizó la técnica operatoria mínimamente invasiva descrita por Khajuria y cols. (37). Una vez anestesiado el animal a intervenir, se rasura la región ventral y se limpia con solución yodada, se realiza una incisión mediana transversa de 0.5 cm en el hemiabdomen inferior por la que se accede a la cavidad abdominal, en la cual se ubican las trompas uterinas. Se localizaron los ovarios por continuidad, los que se extrajeron en su totalidad, se realiza hemostasia por ligadura de las arterias ováricas con sutura absorbible, luego se cierra la cavidad con sutura discontinua en dos planos.

Después de la operación se les administró una dosis de penicilina/estreptomicina 200 000UI/200 mg (2mg/Kg) intramuscular STAT manera profiláctica (23). Se siguió con las pautas dadas por las Guías del Comité Asesor para investigación animal para roedores post operados (33).

Técnica de colpocitología (frotis vaginal) en ratas

Después de 4 semanas de realizada la intervención quirúrgica se realizó el frotis vaginal para evaluar la repercusión de la ovariectomización en las fases del ciclo estral, mediante la observación al fresco al microscopio óptico de las características de las células del epitelio vaginal.

Se obtuvo una muestra de la secreción vaginal mediante la introducción de la punta de una pipeta Pasteur con bordes romos de 0.1 ml de solución fisiológica (NaCl 0.9%) en la cavidad vaginal de la rata. Se aspiró el contenido con una pipeta descartable. Se vertió el contenido sobre un portaobjeto limpio y desengrasado, se distribuyó uniformemente mediante frotis y se observó en el microscopio de luz y con contraste de fases a 400

aumentos (38). Se aplicó fijador en spray M-FIX® para su preservación

Previo al sacrificio se realizó nuevamente frotis para apreciar si hubo cambios en el epitelio vaginal por efecto estrogénico. Se obtuvieron las muestras de igual manera, se fijaron y se les realizó tinción papanicolau.

Densitometría ósea

Los especímenes fueron anestesiados previamente para su adecuada inmovilización con una mezcla de ketamina (40 mg/kg) y xilacina (10 mg/kg) (23), administrada por vía intraperitoneal. Se calibró al equipo de densitometría con una intensidad de 300 mA y una ventana de 1.7-3.3 mm.

Se posicionaron a los animales con el vientre hacia abajo, con las extremidades inferiores abducidas 60°. (Anexo 3).

Para la obtención de la DMO se empleó el equipo de absorciometría dual de rayos X (DXA) HOLOGIC® QDR-2000, que incorpora el software Discovery DXA System, las mediciones fueron realizadas usando el modo de alta resolución regional para pequeños animales que incluyen a ratas, gatos y conejos debido su baja densidad ósea (39), seleccionándose un área de 65 x 20 mm². Se empleó un detector colimador de una sola hendidura en el generador de rayos X.

Análisis bioquímicos: toma de muestras para laboratorio

Se realizaron pruebas bioquímicas para medir los marcadores bioquímicos de remodelado óseo. Los de formación ósea como la fosfatasa alcalina total y la osteocalcina, y los de resorción como el telopéptido amino-terminal del colágeno tipo I (NTX). Otra investigación determinó algunos de estas pruebas bioquímicas en ratas Sprague Dawley (40). Se midió además los valores de calcio (Ca) y fósforo (P) sérico.

Para la extracción de las muestras de sangre se anestesió a las ratas mediante inhalación de vapor de éter dietílico. Se realizó punción intracardiaca con el objetivo de extraer 3 ml de sangre por animal. Dicho contenido se mantuvo en tubos heparinizados, los que fueron refrigerados hasta su procesamiento en el Laboratorio de Análisis Clínico del Instituto de Investigaciones de la UNMSM del Hospital Nacional 2 de mayo (Anexo 5).

Sacrificio

Con el fin de aminorar el sufrimiento en los animales de experimentación durante el sacrificio, se anestesió a las ratas con vapor de éter etílico. Una vez inducido el plano anestésico 1 ó 2, donde no se evidenciaban movimientos involuntarios, se llevó a cabo el procedimiento descrito en la Guías de Eutanasia de La Sociedad Americana de Medicina Veterinaria (AVMA) (36). Se mantiene como punto fijo la porción cervical y en ángulo de 30° se procede con el desnucamiento, el cual va precedido muchas veces de un sonido característico, que indica que el procedimiento se llevó a cabo con éxito.

Estudio morfométrico: Preparación y lectura de láminas

Las vértebras lumbares (LV2 y LV3) y el fémur derecho fueron fijados en formol neutro por 24 horas, luego descalcificado con una solución de ácido fórmico al 15% por 5 días y posteriormente procesadas para su inclusión en bloques de parafina, los que fueron cortados a 5µm en un micrótomo, los cortes fueron coloreados con hematoxilina-eosina.

El análisis histológico y la morfométrico fueron realizados por la captura de imágenes con una cámara digital NikonSight DS-Fei acoplada a un microscopio Nikon Eclipse E 200 LED y analizadas con el software suministrado por el fabricante de la misma en la pantalla de la Unidad de control DS-L3 Nikon. Para cada animal se hicieron 60 mediciones en cortes

de las trabéculas encontradas en el cuerpo de la segunda vértebra lumbar y la cabeza del fémur. Las mediciones y las fotografías fueron obtenidas a 100X y la unidad de medida fue la micra.

VI. RESULTADOS

La **extracción del extracto alcaloidal** (EA) del ecotipo amarillo del *Lepidium meyenii* tuvo un rendimiento de 0.288 el que se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% EA = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100 = \frac{2.88 \text{ g}}{1000 \text{ g}} = 0.288$$

La detección de alcaloides dio positivo a los diferentes reactivos: Dragendorf, Wagner y Mayer (Anexo 3, fig 13). En la cromatografía de capa fina de la muestra sin acidificar, se observan los 4 alcaloides: macainas 1, 2, 3 y 4 reportadas por la Dra. Chacón (25)

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron cromatofolios de silicagel de 1.8 x 10 cm, se trabajó con la muestra del extracto de Maca (sin acidificar) disuelto en cloroformo, la mezcla como fase móvil fue cloroformo: metanol: amoniaco (2:0.125:0.02), para el revelado de las placas se usaron diferentes reactivos tales como: Dragendorff - solución de KI y Wagner.

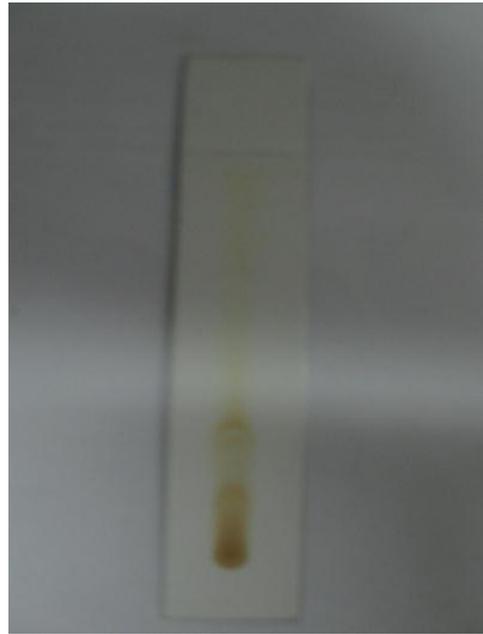
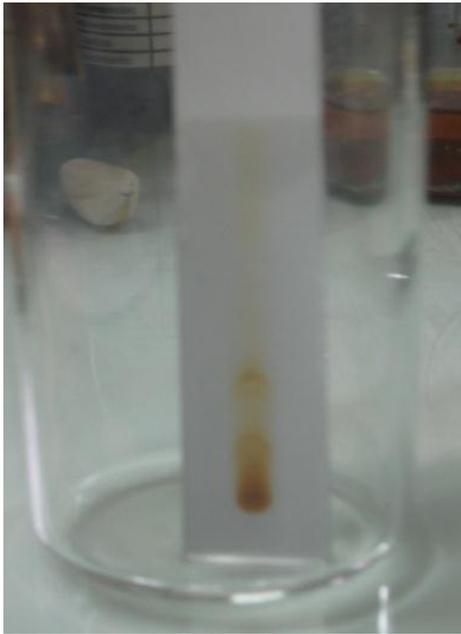


Figura 14.- Cromatografía en capa fina. Izquierda: separación de componentes. Derecha: puntos de separación

Los puntos de separación no se aprecian nítidamente, luego de agregar el reactivo de Dragendorff se aprecia algunos puntos. Para dar mayor color y nitidez a los puntos de separación, se sumerge el revelado en solución de yoduro de potasio (Figura 15).

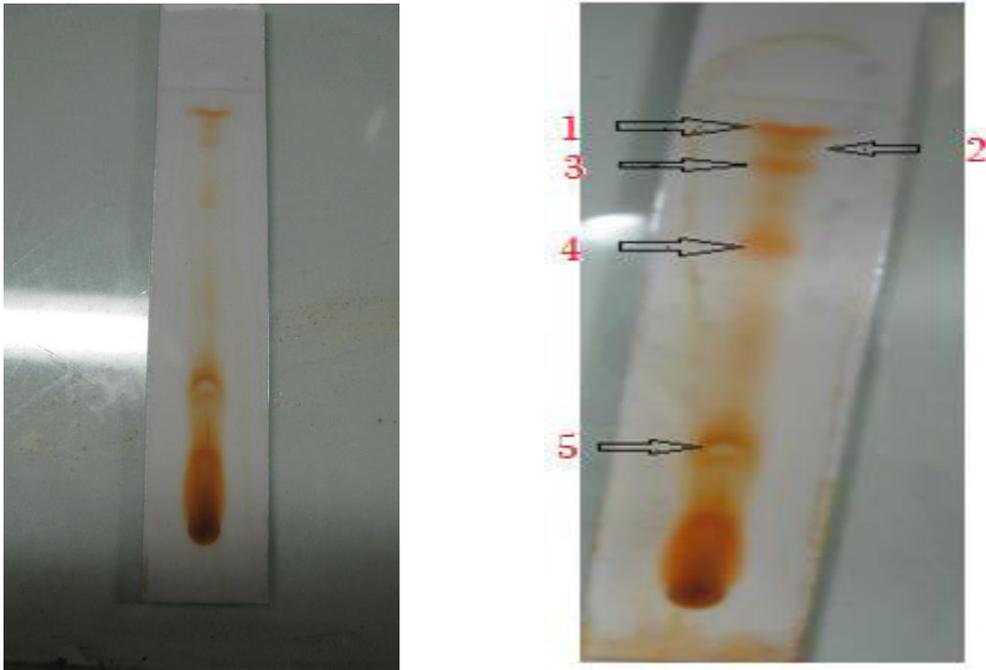


Figura 15. Revelado con solución de Dragendorff- solución de yoduro de potasio (KI). Izquierda: separación de componentes. Derecha: puntos de separación.

Las placas reveladas con reactivo Dragendorff – solución de yoduro de potasio muestran 5 puntos de separación de los cuales los puntos 1, 3, 4, 5 (posibles macainas) son mayoritarios y los valores de R_f para los puntos fueron: $R_f(1)=0.886$, $R_f(2)=0.914$, $R_f(3)=0.871$, $R_f(4)=0.714$, $R_f(5)=0.314$.

Para realizar descarte de falso positivo para alcaloide se realizó adicionalmente la identificación con reactivo de Wagner en placa de silicagel.

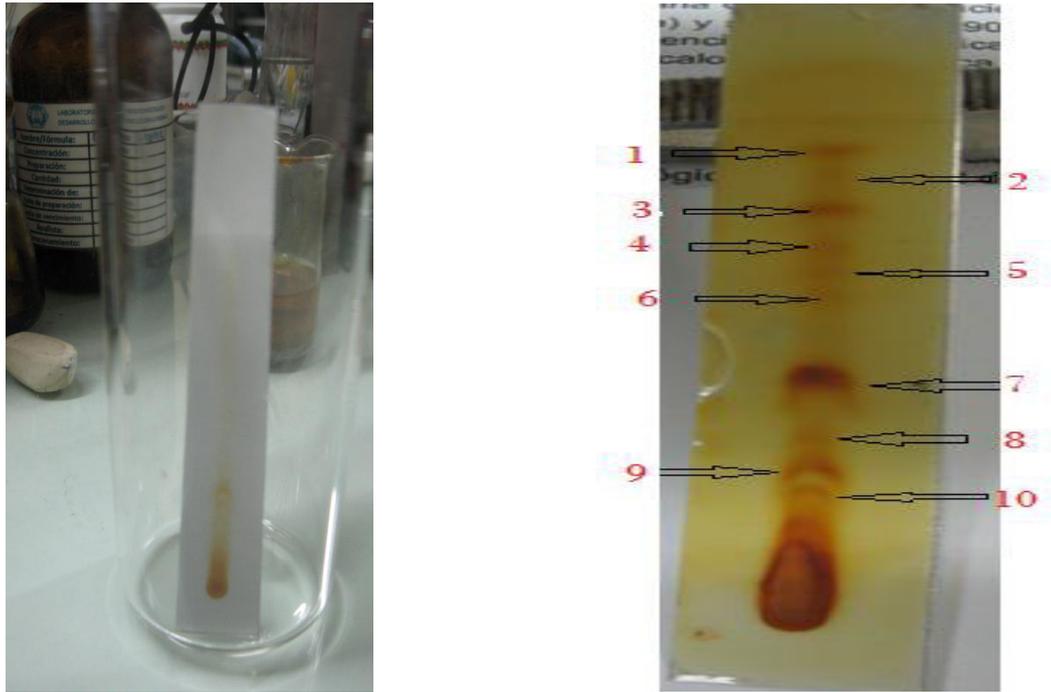


Figura 16. Revelado con reactivo de Wagner. Izquierda: separación de componentes. Derecha: revelado con reactivo de Wagner

Las placas reveladas con el reactivo *Wagner* muestran 10 puntos de separación, los puntos 1, 3, 7 y 9 son mayoritarios. Este reactivo revela la presencia de otros alcaloides presentes en el extracto de la maca que no son visibles con el reactivo de Dragendorff.

Durante el **periodo de adaptación**, de 60 animales que se adquirieron, murieron 10 ratas, a las cuales se les realizó necropsias para conocer la causa de su deceso, encontrándose a la macroscópica, pulmones congestivos con abscesos localizados, hiperemia a nivel hepático y renal. Por lo que se colocó estufas durante la noche para mantener la temperatura ambiental a 22°C como promedio.

En este periodo se preparó el extracto alcaloidal de *Lepidium meyenii* y el equipo de trabajo recibió la instrucción de la técnica operatoria de la ovariectomización.

Durante la **técnica de ovariectomización** la combinación anestésica de ketamina 40mg/kg y 10g/kg de xilazina indujo un plano quirúrgico óptimo (plano 2). El tiempo de duración de la anestesia fue en promedio de 40 minutos y el de recuperación fue de 4-6 horas aproximadamente. Se registraron 2 muertes en el post operatorio inmediato. No se registraron decesos en el grupo sham.

Se monitorizaron los **pesos corporales** antes de la ovariectomización, y previo al sacrificio. Al finalizar el tratamiento, todos los animales ganaron peso, En el grupo de sham se tuvo una variación significativamente menor al resto de los tratamientos (peso final de $222,44 \pm 23,79$ g vs. $244,13 \pm 19,15$ g del control) mientras que el tratamiento Maca II ($252,35 \pm 9,72$ g) se mantuvo con valores similares a los presentados por el grupo estrógeno ($248,06 \pm 11,02$) y el control ($244,13 \pm 19,15$) (Cuadro N° 4 y Figura N° 17).

Cuadro N° 4: Valores del peso corporal inicial (PCi), final (PCf) y del útero (P. útero) para los diferentes grupos de tratamiento.

Grupo	PCi	PCf	P. útero
Control	$209,75 \pm 11,06$	$244,13 \pm 19,15^\circ$	$0,0870 \pm 0,028^\circ$
Sham	$196,75 \pm 18,79$	$222,44 \pm 23,79^*$	$0,4887 \pm 0,239^*$
Estrógeno	$204,05 \pm 11,84$	$248,06 \pm 11,02^\circ$	$0,1480 \pm 0,108^\circ$
Maca I	$203,95 \pm 16,50$	$241,45 \pm 6,76$	$0,0870 \pm 0,015^\circ$
Maca II	$211,10 \pm 9,50$	$252,35 \pm 9,72^\circ$	$0,0880 \pm 0,021^\circ$

* Diferencias significativas frente al Control, para un valor $p < 0,05$. ° Diferencias significativas frente al tratamiento Sham, para un valor $p < 0,05$.

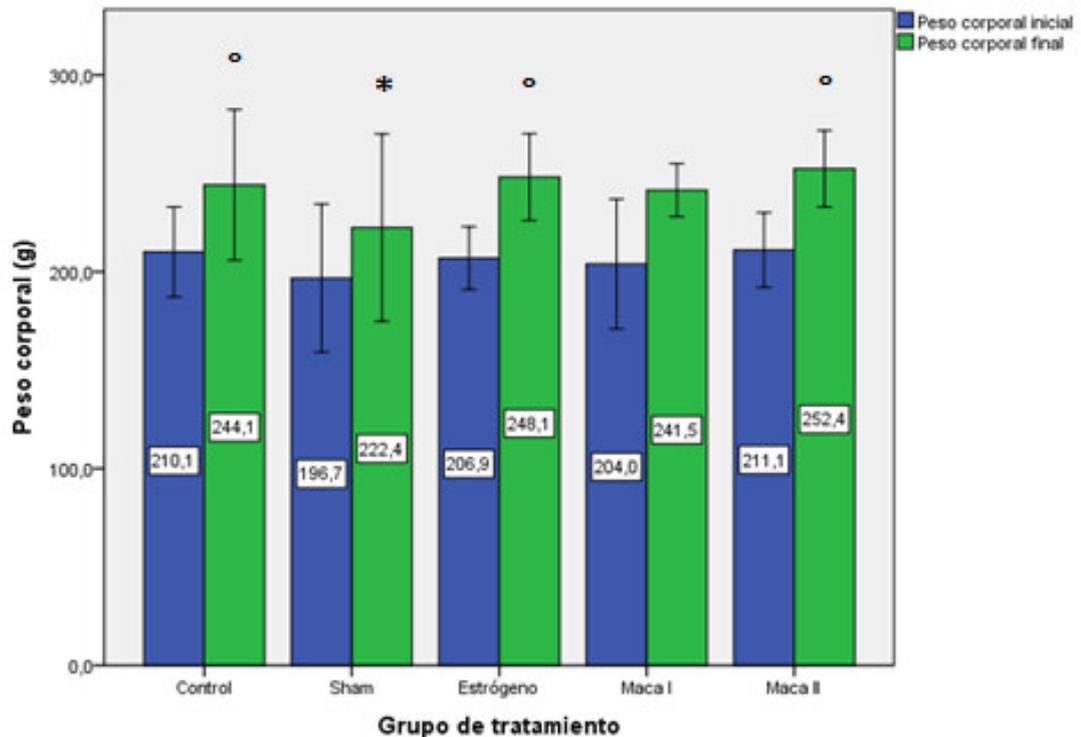


Figura N° 17: Promedio de los pesos corporales iniciales y finales. Para los diferentes grupos de tratamiento, se observó diferencias significativas en los pesos corporales finales. * Diferencias significativas frente al control, para un valor $p < 0,05$. ° Diferencias significativas frente al tratamiento sham, para un valor $p < 0,05$.

Cuando se realizó la disección de los animales del grupo control, y apreció macroscópicamente gran atrofia del cuerpo y trompas uterinas en comparación con el grupo sham (Figura 18). Esta diferencia se vio reflejada en los valores **peso del útero**. En el grupo Sham ($0,4887 \pm 0,239$ g) fue significativamente superior al del grupo control ($0,0870 \pm 0,028$ g), el grupo maca I ($0,0870 \pm 0,015$ g), maca II ($0,0880 \pm 0,021$ g) y al grupo tratado con estradiol; el cual presentaba una diferencia significativa respecto al grupo control (Cuadro N° 4 y Figura N° 19).



Figura N° 18: Comparación macroscópica entre útero del grupo sham (izquierda) vs control (derecha). Se señala con una fecha el fondo uterino.

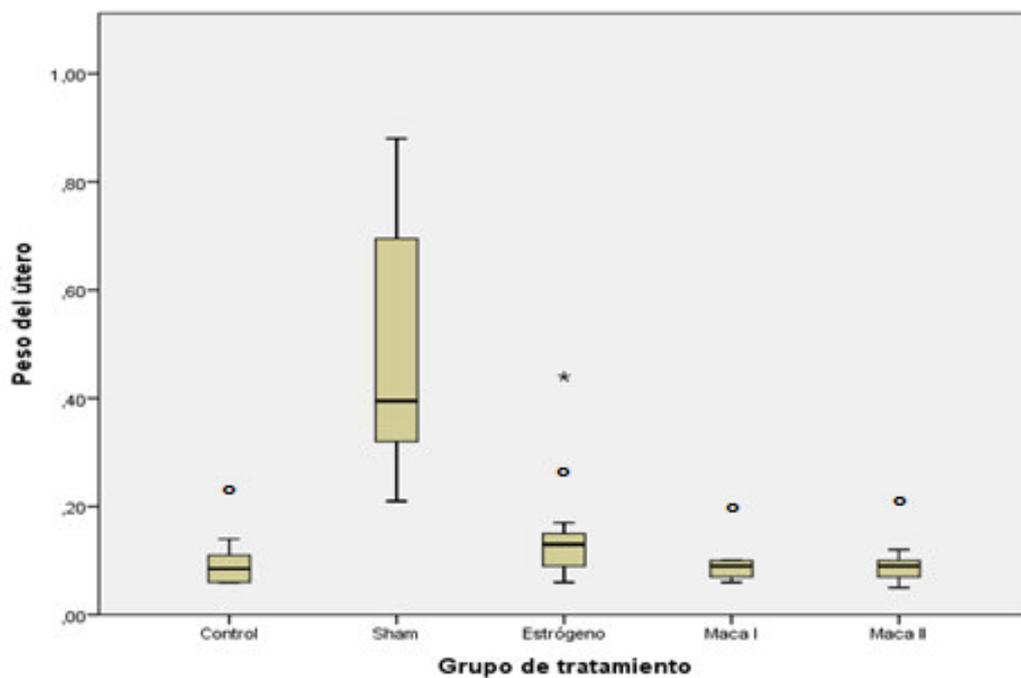


Figura N° 19: Peso de los úteros de los animales sometidos a los diferentes tratamientos. * Diferencias significativas frente al control, para un valor $p < 0,05$. ° Diferencias significativas frente al tratamiento sham, para un valor $p < 0,05$.

En la observación de la citología del **frotis vaginal** de las ratas ovariectomizadas previo al tratamiento, se corroboró la fase diestro (anestrogénica) en todos los animales (Figura 20). En algunos frotices se apreciaron células parabasales y planas (3/38). Se compararon con las muestras de frotis vaginal del grupo sham, en las que se aprecia el predominio de células metaestro, las cuales indican actividad estrogénica en dicho epitelio.

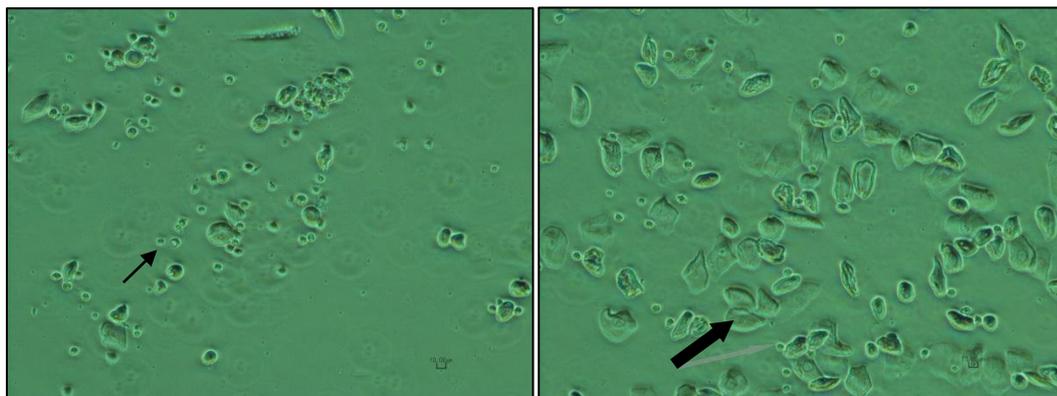


Figura 20. Citología del epitelio vaginal de ratas ovariectomizadas vs sham. Tinción en fresco con contraste de fases. Aumento: 400 x. A la izquierda se observa frotis correspondiente a rata del grupo control en diestro con abundante presencia de leucocitos (flecha delgada). A la derecha del grupo sham en fase metaestro con gran presencia de células epiteliales (flecha)

Durante el periodo de **tratamiento** se hizo la canulación vía orogástrica de los animales acuerdo con la dosis correspondiente (Cuadro 3). No se registraron pérdidas durante este periodo.

Al finalizar el tratamiento se realizaron los **frotices vaginales** luego de culminado el tratamiento, que fueron coloreados con tinción papanicolau. No se apreció efecto estrogénico en el epitelio vaginal. Los frotices mostraban predominio de leucocitos, detritus y células correspondientes a la etapa de diestro (Figura 21).

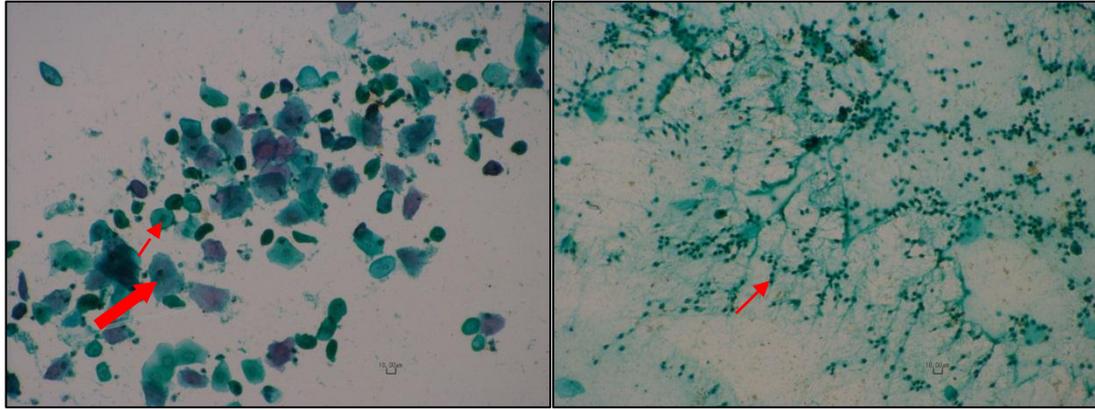


Figura 21. Citología del epitelio vaginal de ratas después del tratamiento. Tinción papanicolau. Aumento: 400 x. A la izquierda citología del grupo sham, con presencia de células superficiales (flecha) e intermedias (flecha discontinua). A la derecha, grupo control con abundante presencia de leucocitos (flecha delgada). No se apreció diferencias significativas en los grupos ovariectomizados.

En la medición de la **densidad mineral ósea (DMO)** de la columna no se evidenció diferencia significativa en sus valores. Sin embargo, en el fémur se observó una reducción significativa en el grupo Maca II ($0,221 \pm 0,016$) frente a lo observado en el grupo sham ($0,251 \pm 0,015$), (Cuadro N° 5, figura N° 22, Anexo 4).

Cuadro N° 5: Valores de la densitometría ósea (DMO) de la columna (C) y del fémur (F).

Grupo	DMO C	DMO F
Control	0,296 ± 0,018	0,244 ± 0,031
Sham	0,302 ± 0,018	0,251 ± 0,015
Estrógeno	0,296 ± 0,011	0,246 ± 0,013
Maca I	0,289 ± 0,018	0,244 ± 0,026
Maca II	0,311 ± 0,022	0,221 ± 0,016°

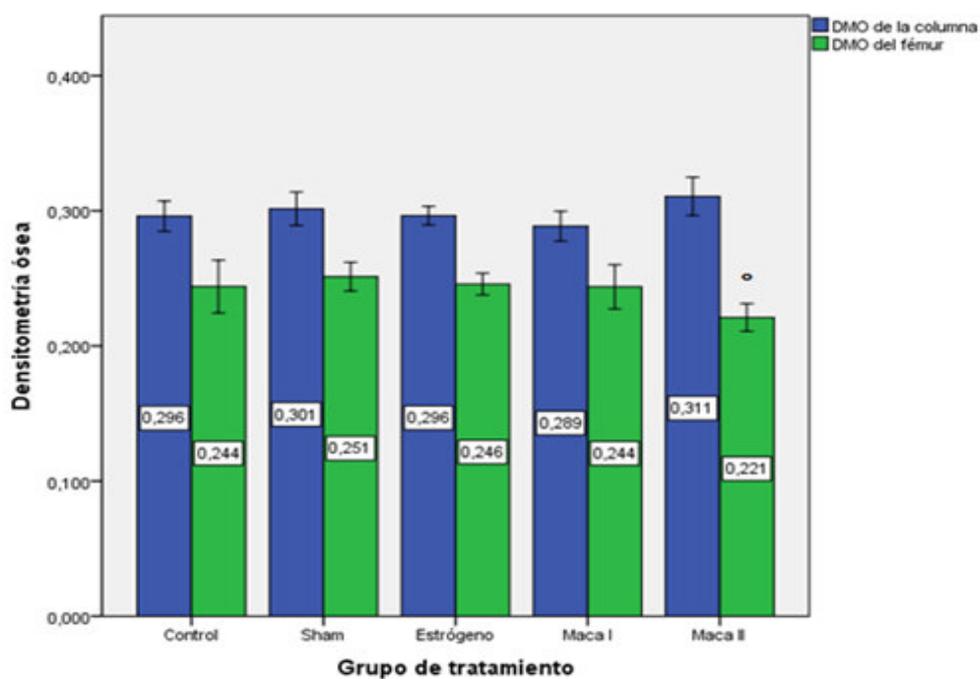


Figura N° 22: Densitometría ósea de la columna y del fémur de los animales de investigación por grupo de tratamiento. ° Diferencias significativas frente al tratamiento Sham.

Los valores de los **marcadores de formación ósea** como **la fosfatasa alcalina** se mantuvieron similares entre el grupo sham ($136,33 \pm 25,01$ UI/L) y el grupo maca II ($141,90 \pm 33,58$ UI/L), estos valores fueron superiores a los observados en el grupo control ($128,88 \pm 36,01$ UI/L) y el grupo tratado con estrógeno ($121,00 \pm 21,02$ UI/L); sin embargo, no presentaron diferencias significativas (Cuadro N°6 y Figura N°23, Anexo 5).

Cuadro N°6: Valores de concentración de la fosfatasa alcalina (FA), del péptido N-terminal del colágeno tipo I (NTX), de la osteocalcina y del estradiol para los diferentes grupos de tratamiento.

Grupo	FA	NTX	Osteocalcina	Estradiol
Control	$128,88 \pm 36,01$	$14,1713 \pm 3,518$	$33,625 \pm 11,414$	$48,813 \pm 11,971$
Sham	$136,33 \pm 25,01$	$10,2350 \pm 2,338$	$41,883 \pm 7,826$	$39,117 \pm 7,194$
Estrógeno	$121,00 \pm 21,02$	$13,5413 \pm 4,473$	$33,240 \pm 8,867$	$38,613 \pm 20,257$
Maca I	$131,00 \pm 27,71$	$13,4222 \pm 3,188$	$38,578 \pm 10,403$	$39,800 \pm 15,012$
Maca II	$141,90 \pm 33,58$	$12,7000 \pm 3,109$	$32,552 \pm 7,537$	$50,940 \pm 20,506$

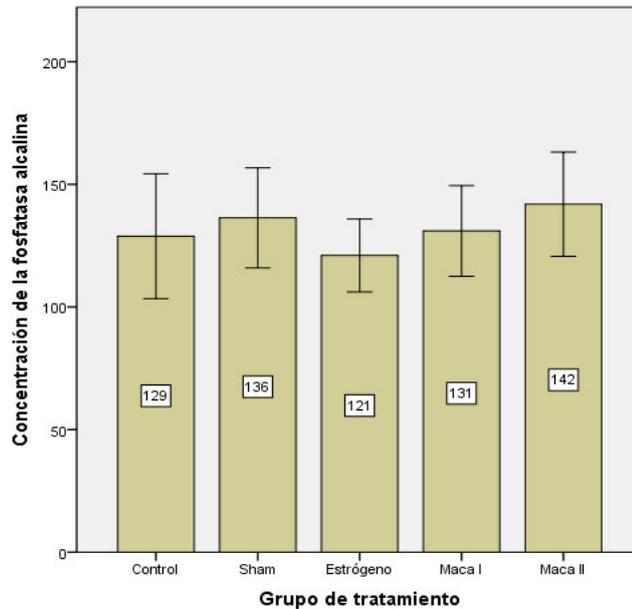


Figura N° 23: Concentración de la fosfatasa alcalina por grupo de tratamiento.

Otro marcador de formación ósea es la **osteocalcina**, sin diferencias significativas. Los grupos sham ($41,883 \pm 7,826\text{ng/ml}$) y maca I ($38,578 \pm 10,403\text{ng/ml}$) presentaron los valores más elevados de concentración de esta proteína. Los grupos control ($33,625 \pm 11,414\text{ng/ml}$), maca II ($32,552 \pm 7,537\text{ng/ml}$) y estrógeno ($33,240 \pm 8,867\text{ng/ml}$) tuvieron valores fueron similares (Figura 24).

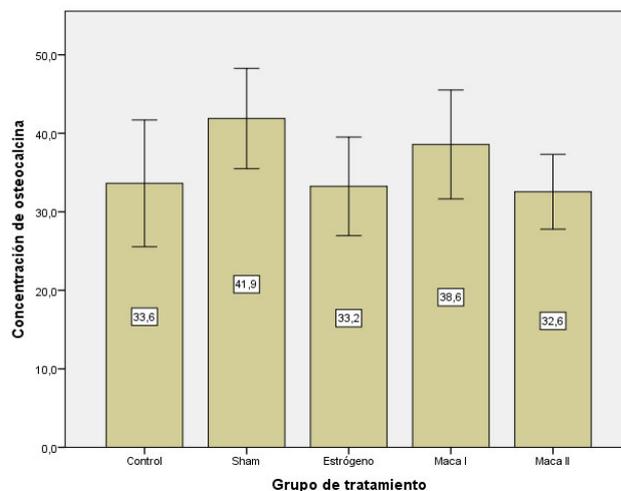


Figura N° 24: Concentración de la osteocalcina por grupo de tratamiento

El marcador de **resorción ósea péptido amino-terminal del colágeno tipo I** (NTX) no presentó variación significativa en comparación con los otros grupos ovariectomizados: estrógeno ($13,5413 \pm 4,473\text{nmol/ml}$), maca I ($13,4222 \pm 3,188\text{nmol/ml}$) y maca II ($12,7000 \pm 3,109\text{nmol/ml}$). Sin embargo resulta significativamente mayor en comparación con el grupo sham ($10,2350 \pm 2,338\text{nmol/ml}$).

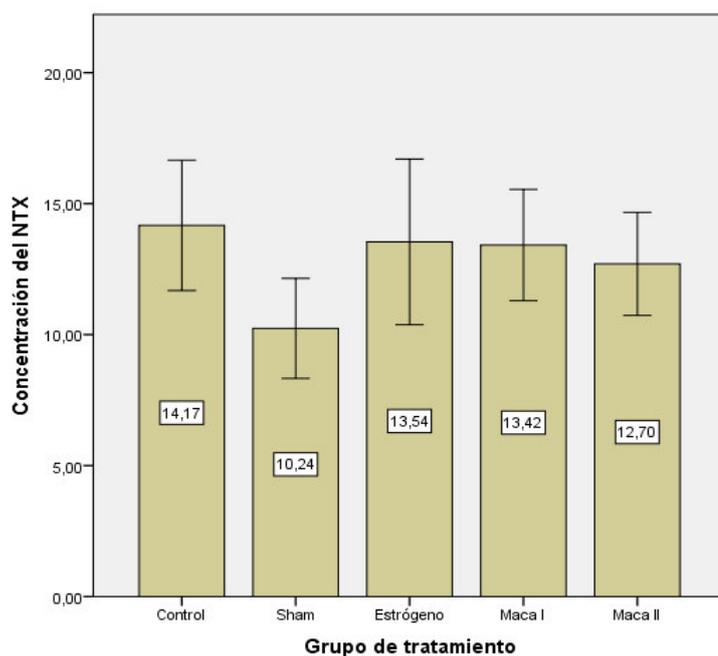


Figura N° 25: Concentración del péptido N-terminal del colágeno tipo I por grupo de tratamiento.

Los niveles de la hormona **estradiol** presente en el grupo tratado en Maca II ($50,940 \pm 20,506$) y el grupo control ($48,813 \pm 11,971$) fue similar y a la vez superior a los grupos sham, estrógeno y maca I (Cuadro N° 6 y Figura N° 26).

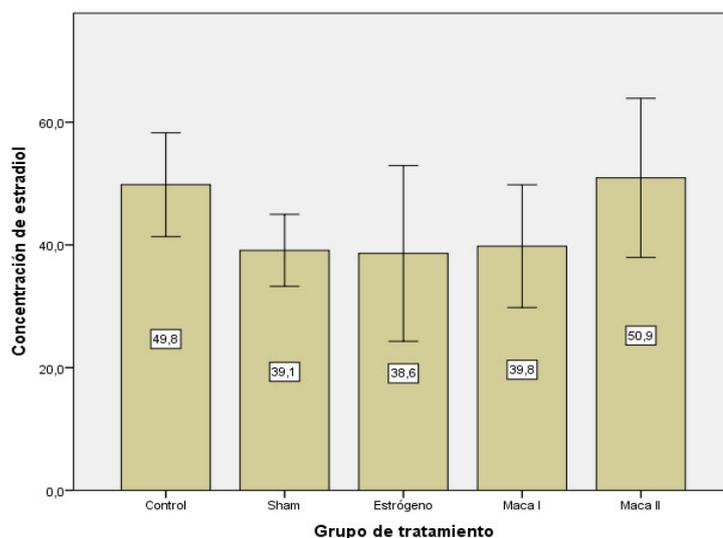


Figura N°26: Concentración del estradiol por grupo de tratamiento.

Los niveles de **calcio** y **fósforo** se mantuvieron prácticamente constantes entre los diferentes grupos de tratamiento (Cuadro N° 7y Figura N° 27).

Cuadro N° 7: Valores de la concentración de calcio (Ca) y fósforo (P) en los animales de investigación por grupo de tratamiento.

Grupo	Ca	P
Control	9,263 ± 0,381	3,338 ± 0,501
Sham	8,850 ± 0,784	3,283 ± 0,512
Estrógeno	9,113 ± 0,712	3,750 ± 0,719
Maca I	8,933 ± 1,019	3,756 ± 0,436
Maca II	9,032 ± 0,739	3,780 ± 0,559

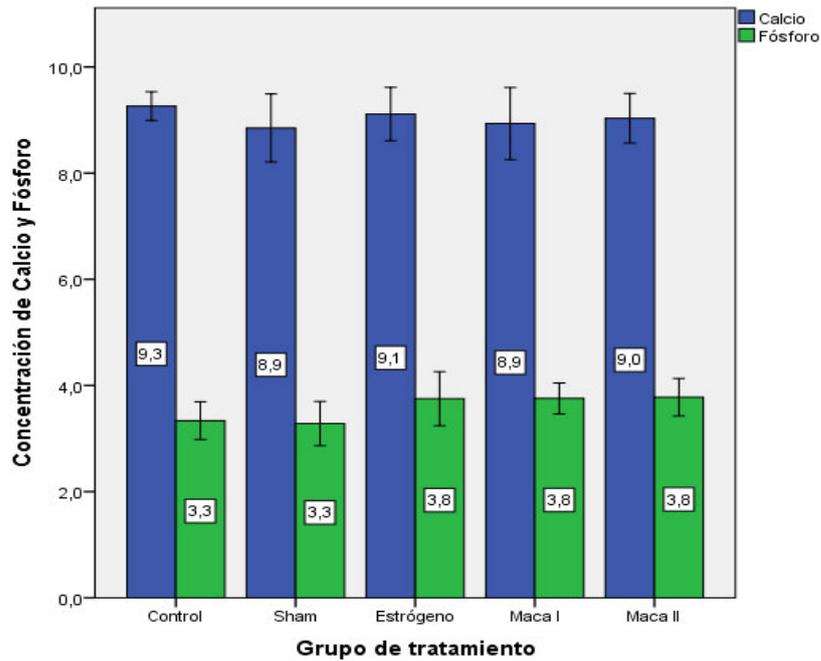


Figura N° 27: Concentración del Calcio y Fósforo por grupo de tratamiento.

En la **histopatología** se midieron comparativamente los **grosos de las trabéculas**. A nivel del **fémur** el grosor entre el grupo de maca II ($58,030 \pm 4683$) y sham ($54,620 \pm 2,312$) fueron similares y superiores al resto de tratamientos y en las trabéculas de la **segunda vértebra lumbar** se apreció que los valores del grupo Maca II ($58,030 \pm 4683$) y sham ($54,620 \pm 2,312$) fueron significativamente superiores al resto de tratamientos, siendo el grupo control el que mostró el menor valor ($47,570 \pm 2,564$). (Cuadro N°8 y Figura N° 26, 27 y 28).

Cuadro N° 8: Valores del grosor de las trabéculas del fémur (F) y la segunda vértebra lumbar (V).

Grupo	Trabécula F	Trabécula V
Control	60,681 ± 5,159	47,570 ± 2,564
Sham	68,440 ± 8,152*	54,620 ± 2,312*
Estrógeno	62,766 ± 5,624	51,589 ± 4,137
Maca I	61,547 ± 6,093	55,097 ± 2,464*
Maca II	67,837 ± 13,99*	58,030 ± 4683 ^a

Diferencias significativas frente al Control. ° Diferencias significativas frente al tratamiento Sham. ^a Diferencias significativas frente al tratamiento con Estrógeno, en los tres casos se consideró para un valor $p < 0,05$.

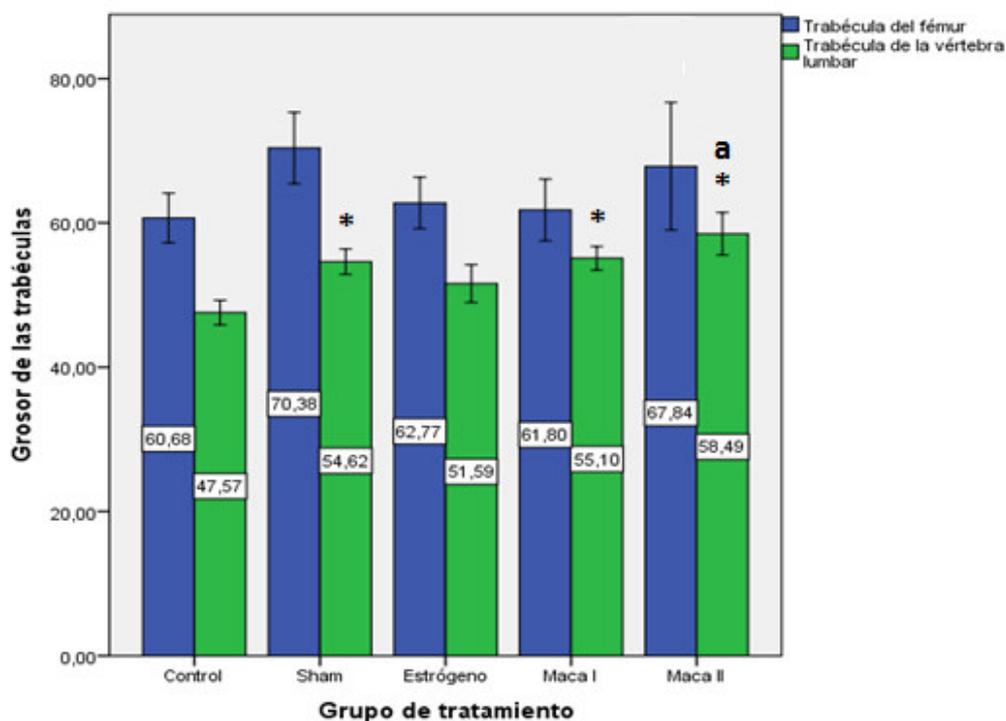


Figura N° 28: Grosor de las trabéculas óseas del fémur y de la segunda vértebra lumbar de los animales de investigación por grupo de tratamiento. * Diferencias significativas frente al Control. ^a Diferencias significativas frente al tratamiento con Estrógeno, en los tres casos se consideró para un valor $p < 0,05$.

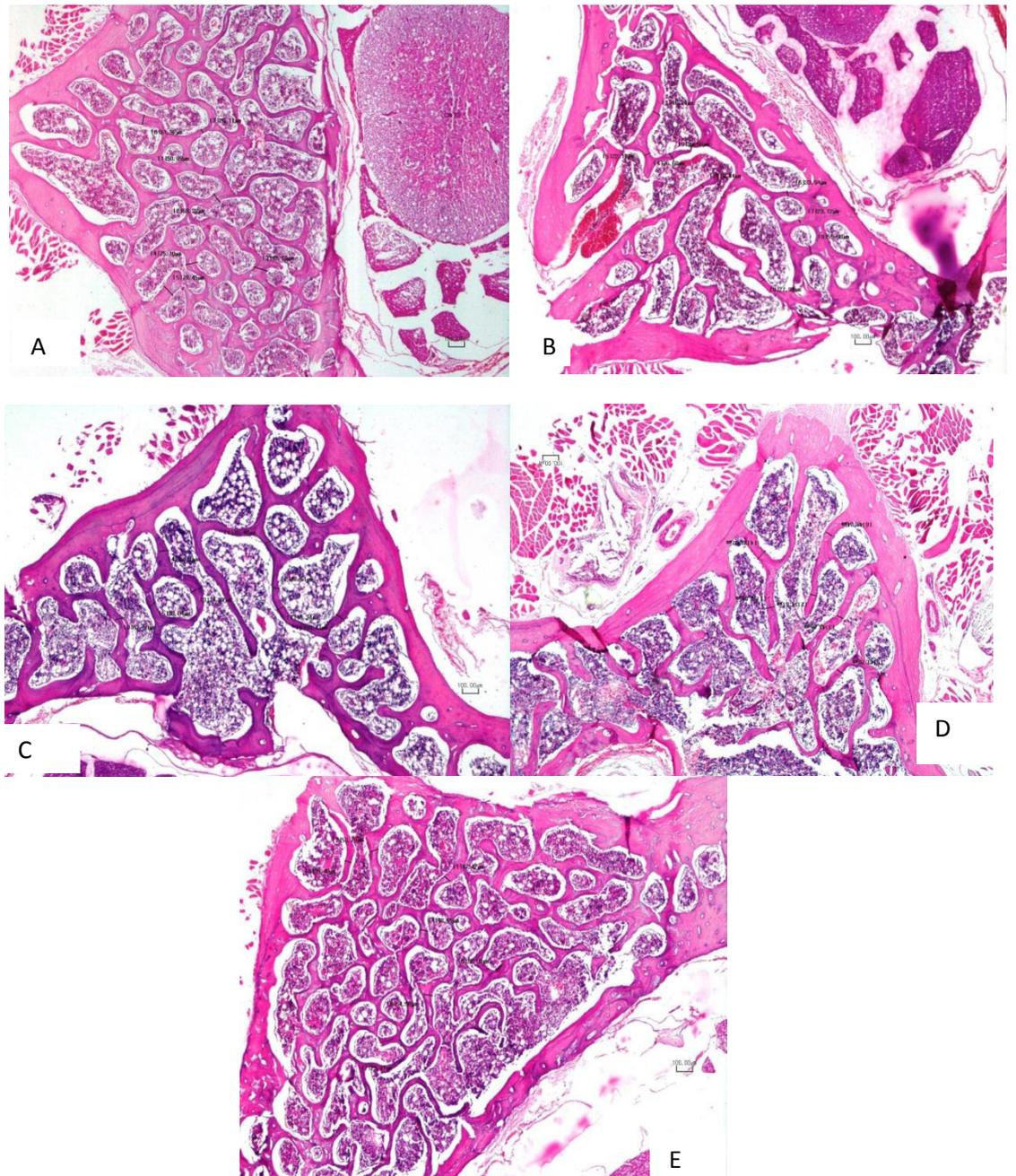


Figura 29. Epífisis del fémur, rata, tinción: hematoxilina-eosina (HE). Aumento: 400x. Obsérvese el grosor de las trabéculas A. sham, B. control C. control (OVX) C. tratada con estrógeno D. tratada con extracto alcaloidal 75 mg/k y E. Tratada con extracto alcaloidal 100mg/Kg. Se pone algunas medidas como ejemplo

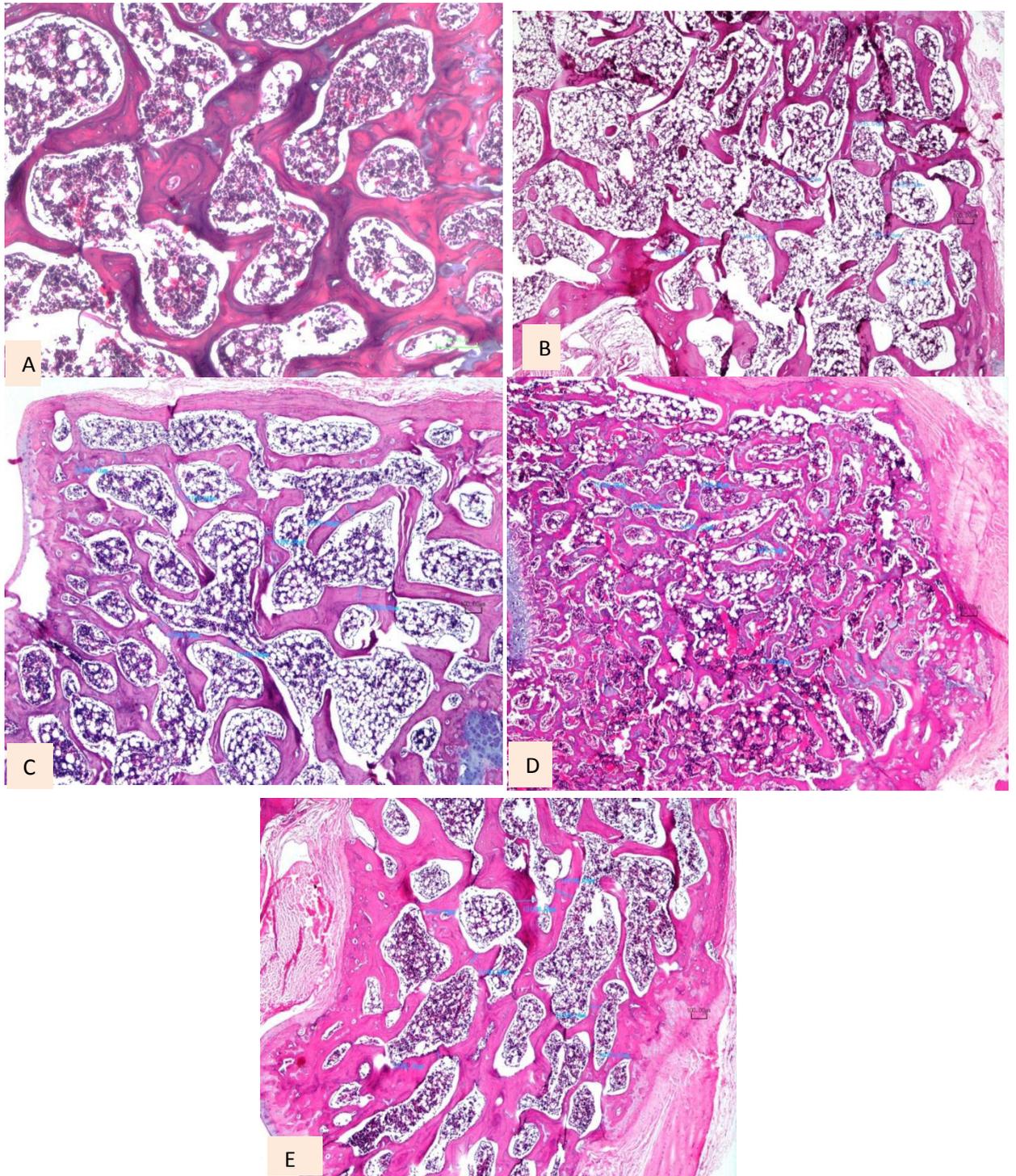


Figura 30., HE, 400x. Cuerpo de la segunda vértebra lumbar, rata. Observe el grosor de las trabéculas A. sham, B. control (OVX), C. Tratada con estrógeno, D. tratada con extracto alcaloidal 45 mg/k y E. Tratada con extracto alcaloidal 100mg/Kg. Se pone algunas medidas como ejemplo.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El presente estudio evalúa el efecto del extracto alcaloidal de la maca amarilla sobre la osteoporosis inducida por ovariectomía en ratas hembras SpragueDawley, variedad escogida por ser la de mayor docilidad y fácil manejo, esta cepa procede de la variedad Wistar, primera en ser desarrollada como modelo animal y en quienes se realizaron los primeros estudios de osteoporosis. (20,21).

El rendimiento en la **elaboración del extracto alcaloidal** de *Lepidium meyenii* es bajo debido a que se debe secar y moler una gran cantidad de materia prima (tubérculos de *Lepidium meyenii*, ecotipo amarillo), esto se espera en una extracción de alcaloides como ocurre en otras especies vegetales, por lo que en la industria farmacéutica se prefiere la síntesis

Durante el **periodo de adaptación** en el mes de junio estos animales fallecieron posiblemente por afecciones respiratorias por los hallazgos macroscópicos de las necropsias, aunque algunos especímenes no mostraron una alteración evidenciable por macroscopía. Los decesos estuvieron propiciados por el descenso de la temperatura durante la noche y madrugada y al mantenerlas aisladas en una jaula individual, evitando así poder darse calor mutuamente.

La **ovariectomización** constituye un modelo experimental sobre el que se induce a un estado semejante a la menopausia en ratas maduras, provoca un incremento de la tasa de remodelamiento sin la correspondiente contrarregulación dada por la actividad estrogénica (19). En este caso se empleó una técnica de acceso ventral, mínimamente invasiva y con menor tiempo operatorio que produjo una baja tasa de mortalidad (5%,) atribuidas a una obstrucción y mal manejo de la vía respiratoria en el post operatorio.

La observación de las células del epitelio vaginal (**frotis vaginal**) permitió la identificación del estado anestrogénico (diestro) en las ratas post ovariectomizadas mediante la visualización al fresco en el microscopio de luz

y contraste de fases. Este método ampliamente aplicado se emplea por ser relativamente sencillo y de bajo costo (39). Permitted comprobar la eficacia de la inducción menopáusica mediante ovariectomía.

Otra técnica que permite apreciar con más detalle estos cambios es la de papanicolau, en la cual se aprecian las características del núcleo y citoplasma (definición del núcleo, visualización del glúcogeno citoplasmático). Se aplicó el papanicolau para la visualización del epitelio vaginal posterior al tratamiento, sin embargo se apreció una gran cantidad de leucocitos y detritus propias de un epitelio atrófico que impidieron una adecuada visualización de los tipos celulares, esto corrobora la ausencia de efecto estrogénico del tratamiento con maca en el epitelio vaginal (41)

La administración de los respectivos **tratamientos** por vía orogástrica mediante canulación, constituyen la vía de elección por tener similar absorción con la vía oral la cual es la más empleada en el tratamiento para la osteoporosis. Sin embargo, en la práctica clínica resulta difícil mantener la adherencia a largo plazo, por lo que la vía intramuscular (empleada en el ácido zolendrónico: 1 aplicación anual) constituye una mejor alternativa debido a que las dosis son más espaciadas. (3)

La variación en el **peso corporal** al finalizar el tratamiento tuvo una diferencia significativa. Los animales del grupo control incrementaron su peso con relación a las del grupo sham, lo cual concuerda con el aumento de tejido grado en ausencia de estrógenos, este aumento no necesariamente está ligado a un incremento en la ingesta (42). Se ha estudiado experimentalmente que en un tiempo mayor (12 semanas) ocurre una disminución significativa del peso en las ratas con dosis plena de terapia de remplazo hormonal (43), lo que no concuerda con nuestros hallazgos posiblemente por la dosis y tiempo de exposición del tratamiento estrogénico. Sin embargo, hubo una leve disminución no significativa del grupo maca I respecto a los demás tratamientos.

La diferencia del **peso uterino** entre el grupo sham y las ratas

ovarectomizadas se atribuye a la ausencia del efecto estrogénico en este órgano reproductor. El grupo estrógeno presentó un incremento significativo frente al control, semejante a lo que ocurre al recibir estrógenos como terapia de remplazo hormonal (43)

Los marcadores de **remodelamiento óseo** constituyen los indicadores a en la valoración a corto plazo en el tratamiento antiresortivo (3,11). Después de 8 semanas de tratamiento se compararon los valores de los marcadores de **formación ósea**. Aunque no hubo diferencias significativas, el grupo maca II presentó los mayores valores de **fosfatasa alcalina (FA)**. La **osteocalcina** tampoco registró diferencias significativas entre los grupos, el grupo sham, sin embargo, tuvo mayor relativo. Estos hallazgos resultan contradictorios con estudios previos (3,6) en los cuales durante el mismo lapso de tiempo se evidenció que los controles presentan mayores valores de FA y osteocalcina debido a un incremento de los procesos de formación ósea subsecuente a la resorción. Por ello se debe tener en cuenta el cambio significativo mínimo de cada marcador que es específico y la variabilidad biológica. (3,6). En el seguimiento clínico estos marcadores disminuyen entre los 2 y 3 meses de tratamiento antiresortivo (3,11,12).

El marcador de **resorción ósea** empleado fue el **péptido amino-terminal del colágeno tipo I (NTX)**, el cual presentó un concordante aumento significativo entre los grupos ovariectomizados frente al grupo sham (3), siendo el grupo control el que presentó mayores valores. Se apreció una discreta disminución en su valor en el grupo maca II, por lo que podría estar ejerciendo un rol protector en la resorción. En el seguimiento clínico, se recomienda además dosar los niveles del telopéptido carboxilo-terminal del colágeno tipo I (CTX). Con un adecuado tratamiento antiresortivo, el nivel de estos marcadores disminuyen en promedio entre 4 a 6 semanas desde su inicio. El uso de los biomarcadores en el modelo animal se encuentra limitado en comparación con su uso en humanos debido a que la proteínas y péptidos varían entre especies, al emplear reactivos de uso clínico resulta en una pérdida de especificidad y sensibilidad de los resultados (3,11,12). Sin

embargo, estos reactivos pueden ser modificados para su uso experimental.

Los niveles de **estradiol** no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, el grupo maca II presentó mayor un valor relativo. Contrario a lo esperado donde se señala que la administración de estrógenos previene la osteopenia y disminuye la resorción ósea en el modelo animal (43), el grupo control tuvo mayores valores respecto al sham. Se ha probado que la maca no ejerce un efecto que eleve directamente los niveles de estrógenos o estimule su receptor (24).

Los niveles del **fósforo** y **cálcio** se mantuvieron sin variaciones, semejante a lo descrito por Zhang y col. Estos valores se estudiaron por encontrarse en directa relación con los procesos de resorción ósea activa (11); sin embargo, no resultan específicos y pueden alterarse con otros procesos patológicos o por la dieta. (11,20)

El uso de la **absorciometría de rayos X de energía dual** (DXA) ha sido validado para evaluar la precisión y exactitud de la **densidad mineral ósea** (DMO) en ratas (38). Sin embargo, el uso del DXA estima del 60 a 70% de la variación de la fuerza ósea en el modelo de estudio animal para la osteoporosis (19).

A nivel de la **segunda vértebra lumbar**, los valores de DMO no presentaron variación significativa en los grupos tratados, aunque el grupo maca II tuvo el mayor valor total lo que podría sugerir un rol protector. No hubo diferencias significativas entre el grupo sham versus el control, por lo que no se evidenciaron los cambios provocados por la ovariectomización. Contrario a lo descrito por Omi (20) donde se indujo una disminución significativa de la DMO en el grupo control durante un periodo de 6 meses, por lo que se puede deducir que este resultado se atribuye al periodo relativamente corto desde la ovariectomía (3 meses).

A nivel de **fémur** proximal se evidenció una reducción significativa de la DMO en el grupo tratado con mayor dosis de maca respecto al grupo sham, lo que resulta contradictorio a lo esperado, dado que este grupo mantiene

intacta su función estrogénica. Si bien se han hecho estudios donde se evidencia que el metabolismo óseo es medible a corto plazo en el cuello del fémur, la ovariectomía no induce pérdida de masa ósea en la epífisis de los huesos largos, lugar donde hicimos nuestra medición (19). El lugar preciso para evidenciar cambios resortivos a corto plazo es la metáfisis distal de la tibia.

El protocolo para el **sacrificio** con inducción anestésica previa a la ejecución fue el más adecuado para facilitar su ejecución y evitar intentos fallidos. El peso de los animales fue en promedio 241 g, el cual no fue impedimento mediante el uso adecuado de la técnica a cargo de un personal entrenado. Aunque las guías recomiendan su uso para animales menores de 200 g y el empleo de otros métodos como la decapitación (36), el desnucamiento cervical resulta el de elección por su bajo costo y relativa facilidad (19).

La DMO por sí sola estima del 60 al 70% de la variación de la fuerza ósea, sin embargo se cuentan con otros parámetros del estudio óseo como la histomorfometría. La cual informa de datos obtenidos en dos dimensiones y su credibilidad se basa en que todos los cortes provengan del mismo nivel (19), lo que se consideró en este estudio. La combinación de los hallazgos de la DMO y la histopatología pueden explicar el 90% de la variabilidad de la fuerza ósea.

La histomorfometría evalúa con precisión la estructura ósea y los índices de fragilidad ósea independientemente de la masa ósea. Los parámetros medidos incluyen el número de osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y osteoblastos activos con relación al perímetro óseo; grosor trabecular, número y separación. En el presente trabajo se midió el grosor de las **trabéculas óseas**. Después de la descalcificación y procesamiento histológico se mantiene indemne la matriz orgánica osteoide, con gran contenido de colágeno tipo I (12), el cual permanece indemne frente a la acción del ácido fórmico empleado.

A nivel de la **segunda vértebra lumbar** se apreció una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento con maca frente al control, aquellos presentaron valores semejantes al grupo sham. El grosor de las trabéculas en el grupo maca II fue significativamente mayor al del grupo tratado con estradiol. Estos hallazgos refieren un rol protector frente a los procesos resortivos inducidos por el cese del estímulo estrogénico. A nivel del **fémur** no se evidenciaron diferencias significativas; sin embargo el grupo maca II tuvo mayores valores frente al resto de tratamientos, a semejanza del grupo sham; lo que contribuye a apoyar la hipótesis del rol antiresortivo del extracto alcaloidal del ecotipo amarillo de la maca. Se dispone de otros métodos como tomografía computarizada cuantitativa periférica (pQCT) el cual complementa la histomorfometría, permite analizar la porción trabecular y compacta separadamente además de detectar cambios tempranos, con el 92 al 98% de precisión (19).

Se desconoce el posible mecanismo por el que actuarían los alcaloides de la maca. Se postula su mecanismo a través de su rol inmunomodulador en la cascada inflamatoria -que se propicia por la edad y la ausencia de estrógenos- que se encuentra incrementada en la menopausia (10). Actuando a través de la inhibición de interleucinas (IL) que promueven la osteoclastogénesis: IL 1, IL-6, IL-17, TNF- α , factor estimulante de monocitos (M-CSF) y el ligando del receptor activador del factor nuclear $K\beta$ (RANKL) (7). Se ha asociado la administración de maca con el incremento del número de leucocitos y la disminución de marcadores inflamatorios (44). Queda aún por demostrar la relación entre la administración del extracto alcaloidal de maca amarilla y su relación con el eje RANK/RANKL y osteoprotegerina (OPG) y mencionado mediadores.

VIII. CONCLUSIONES

1. No se demuestra efecto protector del extracto alcaloidal de *Lepidium meyenii* ecotipo amarillo sobre la osteoporosis inducida en ratas ovariectomizadas.
2. Se determinó el grado de mineralización del hueso después del tratamiento mediante el examen de densitometría mineral ósea. No se demuestra inducción de osteoporosis.
3. Se determinaron los cambios en la arquitectura del tejido óseo trabecular mediante estudio morfométrico, siendo significativos a nivel lumbar en el grupo tratado con la mayor dosis de maca (100 mg/Kg). Por lo que se evidencia un efecto antiresortivo moderado parcial.
4. No se demostró la variación significativa de los marcadores bioquímicos de remodelado óseo.

IX. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda un mayor tiempo de tratamiento (6 meses) que permita la inducción de la osteoporosis y permita evidenciarse mediante la disminución de la densidad mineral ósea.
2. Se debe tener especial cuidado con la precisión del lugar a evaluar en la densitometría. Medir siempre el mismo punto en cada individuo para hacer comparables los resultados para lo que recomienda realizar varias mediciones y tener un sistema adecuado de posicionamiento. Los lugares más idóneos para medir los cambios del remodelado óseo son a nivel lumbar, evitando los platillos de crecimiento, la porción proximal de la tibia y a nivel del cuello femoral.
3. Se recomienda evaluar además del grosor trabecular el número de osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y osteoblastos activos, en el estudio histomorfométrico para una mejor precisión de la calidad de la estructura ósea.
4. No se recomienda dosar los niveles de calcio y fósforo como marcadores de remodelado óseo ya que permanecen constantes, lo que se evidencia en otros estudios.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bocanegra-Broca, Yrma del Cármen, Fernando Joaquín Cruz-Rubio, Carlos de la Cruz-González, Alejandro Jiménez-Sastré. Prevalencia de osteoporosis y ostopenia en mujeres tabasqueñas. Salud en Tabasco [Internet]. 2006, Set.-Dic., [citado el 12 de noviembre de 2016]; 12(3): pp. 505-513. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=4871230>.
2. Sosa Henríquez M, Gómez Díaz J. La osteoporosis. Definición. Importancia. Fisiopatología y Clínica. Rev Osteoporos Metab Miner [Internet] 2010; 2 (Supl 5): S3-S7., [citado el 20 de octubre de 2016] Disponible en: <http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com/pdf/articulos/92010020500030007.pdf>.
3. Vidal Neyra, Luis Fernando; Vidal Wilman, Maritza; Messina, Oswaldo. La Osteoporosis: ¿Cómo y hasta cuando tratarla? Rev. Soc. Peruana Med, Interna.2015; 28(4): 166-186.
4. NIH Consensus Statement. Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. [Internet] 2001 [citado el 2 de diciembre de 2016]. JAMA 2001; 285: 785-795. Disponible en: <https://consensus.nih.gov/2000/2000Osteoporosis111PDF.pdf>
5. Mas, A. Juan, Cabanes T., Marí, B. Prevalencia de osteoporosis y su asociación a factores de riesgo en personas mayores de ambos sexos en Mallorca. Medicina Balear [Internet]. 2007; 22(3): 9-24, [citado el 12 de noviembre de 2016]. Disponible en: <http://ibdigital.uib.es/greenstone/collect/medicinaBalear/index/asoc/Medicina/ Balear2/007v22n3/p009.dir/Medicina Balear2007v22n3p009.pdf>.
6. Sociedad Ecuatoriana de Metabolismo Mineral. Osteoporosis 2015. 1 era Edición. Ecuador: 216 p.
7. Pietschmann, P; Mechtcheriakova, D; Meshcheryakova, A;

- Föger-Samwald, U; Ellinger, I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology*. [Internet] 2016; 62(2), [citado el 12 de noviembre de 2016]. pp: 128-37. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4821368/pdf/ems-64303.pdf>.
8. Neyro, José Luis Neyro; Cancelo, María Jesús; Palacios, Santiago. Inhibición del RANK-L en la fisiopatología de la osteoporosis. Evidencias clínicas de su empleo. *Ginecol Obstet Mex*. [Internet] 2013;81, [citado el 04 de enero de 2017]. pp: 146-157. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2013/gom133e.pdf>.
9. Khosla, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology*. [Internet] 2001 Dic.; 142(12), [citado el 25 de diciembre de 2016] pp: 5050-5. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/eedb/d21edfd4c221424281c1f92426223aaac5db.pdf>.
10. Rosen, Clifford, J; Bouxsein, Mary L. Mechanisms of Disease: is osteoporosis the obesity of bone? *Nat Clin Pract Rheumatol*. [Internet] 2006 Jan; 2(1) [citado el 20 de enero de 2017] pp: 35-43. Disponible en: <http://www.nature.com/nrrheum/journal/v2/n1/pdf/ncprheum0070.pdf>.
11. Romero Barco, Carmen M.; Manrique Arija, Sara; Pérez, Manuel Rodríguez. Marcadores bioquímicos en osteoporosis. Utilidad en la práctica clínica. *Reumatol Clin*. [Internet] 2012; 8(3), [citado el 03 de enero de 2017] pp: 149-52. Disponible en: file:///C:/Documents%20and%20Settings/usuario/Mis%20documentos/Downloads/S1699258X11001811_S300_es.pdf.
12. Reynaga Montecinos, Belen, Zeni, Susana Noemí. Marcadores bioquímicos del remodelamiento óseo. Utilidad clínica. *Acta bioquím. clín. latinoam*. [Internet] 2009 abr.-jun; 43(2), [citado el 18 de octubre de 2016] pp: 177-93 Disponible en:

http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572009000200002.

13. Lee, MS; Shin, BC; Yang, EJ; Lim, HJ; Ernst, E. Maca (*Lepidium meyenii*) for treatment of menopausal symptoms: A systematic review. *Maturitas*. 2011 Nov; 70(3): 227-33.
14. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. [Internet] 2013, [citado el 18 de octubre de 2016]. pp: 30- 55. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>.
15. Arias Ramírez, Ángela Renee. Biotecnología y metabolitos secundarios en *Lepidium Peruvianum* Chacón, “Maca”. UNMSM. Tesis [Internet] 2002. [citado el 15 de diciembre de 2016]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/1401>.
16. Gonzales, Gustavo F., Leonidas Villaorduña, Manuel Gasco, Julio Rubio, Carla Gonzales. Maca (*Lepidium meyenii* Walp). Una revisión sobre sus propiedades biológicas. *Rev. Peruana Med Exp Salud Pública*. [Internet] 2014; 31(1), [citado el 15 de julio de 2016] pp: -10. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/rpmesp/v31n1/a15v31n1.pdf>. 100
17. Valerio, Luis G., Gustavo F. Gonzales. Toxicological Aspects of the South American Herbs Cat's (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*) A Critical Synopsis. *Toxicol Rev*. 2005, 21 (1): 11-35.
18. Gutiérrez, H.1; Gutiérrez, R.1; Herles, E.1; Hernández, M.1; Horna, P.1; Hoyos. Análisis comparativo de la toxicidad del extracto acuoso en cocimiento de la harina de maca (*Lepidium meyenii*, Walp) en tres especies de animales modelos: *Artemia franciscana* (Crustácea, Anostraca), pez Guppy (*Poecilia Reticulata*) y ratón (*Mus musculus*). *Rev Horizonte Médico*. [Internet] 2007; 7 (2). pp: 103-108. Disponible en: <http://www.horizontemedicina.usmp.edu.pe/index.php/horizonte>

med/article/view/218/233

19. Pavlos P, Lelovas; Therodoros T Xanthos; Thoma, Sofia E.; Lyrits P, George; Dontas, Ismene A. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Medicine*. [Internet] 2008; Oct 58(5), [citado el 5 de enero de 2017]. Disponible en: <http://docserver.ingentaconnect.com/deliver/connect/aalas/15320820/v58n5/s1.pdf?expires=1487624526&id=89970602&titleid=72010023&accname=Guest+User&checksum=C7459D2EF509A7F8C3EA44E876CD6212>
20. Omi, N., Ezawa, I. The effect of ovariectomy on bone metabolism in rats. 1995. *Bone* 17, 163S - 168S.
21. García-Moreno Carmen, Calvo, Olga M., Herrero, Saturnino, Heterogeneous Decrease of Bone Mineral Density in the Vertebral Column of Ovariectomized Rats. 1995. *Bone* 16 (4): 295S-300S.
22. Zhang Y, Yu L, Ao M, Jin W. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp on osteoporosis in ovariectomized rat. *J Ethnopharmacol*. 2006; 105 (1-2): 274-9.
23. González C, Cárdenas-Valencia I, Leiva-Revilla J, Anza-Ramirez C, Rubio J, Gonzales GF. Effects of different varieties of Maca (*Lepidium meyenii*) on bone structure in ovariectomized rats. *Forsch Complement Med*. 2010; 17(3):137-43.
24. Gonzales, G F; Córdova, A; Vega, K; Chung, A; Villena; Góñez, C. 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*. [Internet] 2003. 176 [citado el 5 de enero de 2017] pp: 163–168. Disponible en: <http://joe.endocrinology-journals.org/content/176/1/163.full.pdf+html>
25. Chacón, G. Estudio Fitoquímico de *Lepidium meyenii* (Walp). Tesis. UNMSM. Lima-Perú, 1961.
26. Bianchi, Antonio. Maca *Lepidium meyenii*. Boletín

- Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas. [Internet] 2003 mayo; 2(3), [citado el 15 de enero de 2017]. pp. 30-36. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85620303.pdf>
27. Piacente, Sonia; Carbone, Virginia; Plaza, Alberto; Zampelli, Aurelia; Cosimo Pizza. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp). *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50 (20): 5621–5625.
28. Muhammad, Ilias; Zhao, Jianping; Chuck Dunbar, D; Khan, Iklas A. Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca'. *Phytochemistry* [Internet] 2002, 59, [citado el 16 de noviembre de 2016] pp: 105–110. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/11602481_Constituents_of_Lepidium_meyenii_'maca'.
29. Cui, B; Zheng B. L.; He, K; Zheng, Q. Y. Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*. *J. Nat Prod.* 2003 Aug; 66(88): 1101-03.
30. Jin, Wenwen; Xhen, Xuemin; Dai, Pengfei; Yu, Longjiang. Lepidine C and D: Two New imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae) roots. *Phytochemistry Letters.* 2016, 17: 58-161.
31. Li, Huiy; Miyahara, Tatsuro; Tezuka, Yasuhiro; Tran, Quan Le; Seto, Hikaru; Kadota, Shigetoshi Effect of Berberine on Bone Mineral Density in SAMP6 as a Senile Osteoporosis Model. 2003. *Biol. Pharm Bull* 26(1): 110-111.
32. Makoto Kuramotoa, Kohji Yamaguchib, Tomoko Tsujib, Daisuke Uemurac. Zoanthamines Antiosteoporotic Alkaloids. *Drugs from the Sea.* [Internet] 2000, [citado el 10 de enero de 2017] pp: 98-106. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3783880/pdf/marinedrugs-02-00039.pdf>.
33. Office of Animal Care and Use of National Institutes of Health. Guidelines for Survival Rodent Surgery. [Internet] 2012. , [citado el 15 de enero de 2017]. 6 p. Disponible en:

- https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/rodent_surgery.pdf
34. Office of Animal Care and Use of National Institutes of Health. Guidelines for Pain and Distress in Laboratory Animals, Responsibilities, Recognition and Alleviation. [Internet] 2015, [citado el 15 de enero de 2017]. 6 p Disponible en: https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/pain_and_distress.pdf
35. Ley de protección a los animales domésticos y a los animales silvestres mantenidos en cautiverio. Pub. Ley N° [Internet] (May. 22, 2000), [citado el 15 de enero de 2017]. Disponible en: <http://sinia.minam.gob.pe/normas/ley-proteccion-animales-domesticos-animales-silvestres-mantenidos>.
36. AVMA. Guidelines for the Euthanasia of Animals. [Internet] 2013, [citado el 10 de enero de 2017]. Disponible en: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf>
37. Khajuria, Deepak Kumar; Razdan, Rema, Mahapatra, D Roy. Description of a new method of ovariectomy in female rats. Rev Bras Reumatol. [Internet] 2012; 52(3), [citado el 12 de enero de 2017]. pp: 462-470. Disponible en: http://www.scielo.br/pdf/rbr/v52n3/en_v52n3a16.pdf.
38. Grier, S. J.; Turner, A. S.; Alvis, M. R. The use of Dual-Energy X-ray absorptiometry in Animals. Investigative radiology. 1996, Jan; 31(1): 50-62.
39. Marcondes, F. K.; Bianchi, F. J.; Tanno, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: Some Helpful considerations. Braz. J. Biol. [Internet] 2002. 62(4A), [citado el 12 de enero de 2017] pp: 609-614. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/bjb/v62n4a/a08v624a.pdf>.
40. León Goñi, Avelina; Blanco, Diuris; Peña, Amelira; Ronda, Marisel; Gonzales, Bárbara; Arteaga, María y col. Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley

- producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD. Rev. electrón. Vet. [Internet] 2011; 12(11) [citado el 12 de enero de 2017], 10 p. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111111/111101.pdf>.
41. De la Cruz, Rosa R.; Pásaro, Rosario. Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. Rev Enseñanza Univ Extraordinario. [Internet] 1998, [citado el 17 de enero de 2017]. pp: 545, 554. Disponible en: http://institucional.us.es/revistas/universitaria/extra1998/art_50.pdf
42. Ganancia de peso corporal a partir de la menopausia y perfil alimentario en una muestra de mujeres de la ciudad de Buenos Aires. Actualización en Nutrición; 16(2). [Internet] 2015, junio pp: 41-50.), [citado el 03 de enero de 2017]. Disponible en: http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_16/num_2/RSAN_16_2_41.pdf.
43. Mohamed, M. K.; Abdel-Rahman, A. A. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. European Journal of Endocrinology. [Internet] 2000, [citado el 03 de enero de 2017]. pp: 142 307–314. Disponible en: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.326.59&rep=rep1&type=pdf>.
44. Večeřae, Rostislav; Orolin, Jan; Škottová, Nina; Kazdová, Ludmila, Oliyarnik, Olena; Ulrichová, Jitka; Šimánek, Vilím. The influence of maca (*Lepidium meyenii*) on antioxidant status, lipid and glucose metabolism in rat. Plant Foods for Human Nutrition. 2007June; 62, (2): 59–63

X. ANEXOS

Anexo 1. Certificación adquisición ratas Sprague Dawley


UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

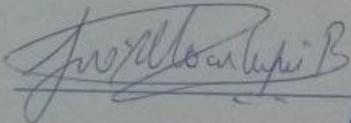
LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO (LID) "ABRAHAM VAISBERG WOLACH"
LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA COMPARADA

Mediante el presente se da constancia de la adquisición de 60 especímenes hembra ratas albinas adultas de la variedad Sprague Dawley.

Se expide esta constancia para fines que el interesado(a) convenga.

Lima, 15 de junio de 2014

Atentamente:


Lic. José Luis Macarlupú Bernués



Laboratorio de Fisiología Comparada-LID/Unidad de Transporte de Oxígeno-IIA
Universidad Peruana Cayetano Heredia
Av. Honorio Delgado 430, Lima 31
Lima-Perú

Anexo 2 .Elaboración del extracto alcaloidal de *Lepidiummeyenii*

Fig. 2 Molienda de harina de maca



Extracción ácido-básica



Fig. 3 Maceración



Fig. 4 Filtración



Fig. 5. Concentración

metanólica en la parte inferior



Fig. 6. 1er lavado



Fig. 7. 2do lavado



Fig. 8. 3er lavado



Fig. 9. Sol.
hexano



Fig. 10. 1er extracto



Fig. 11. 2do extracto



Fig 12. 3er extracto

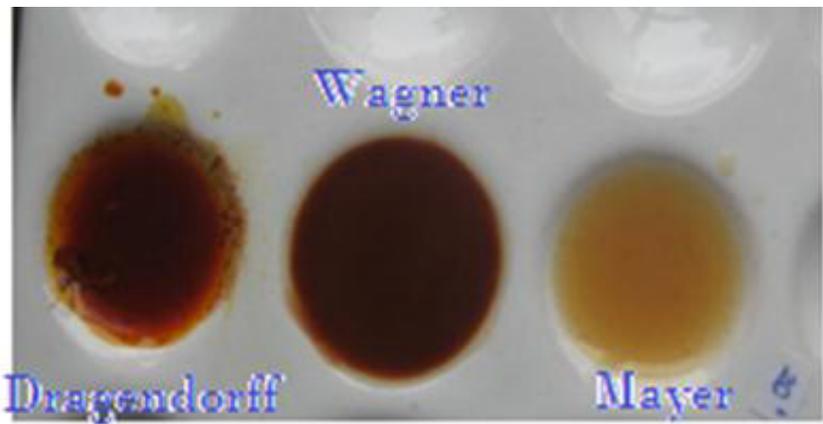
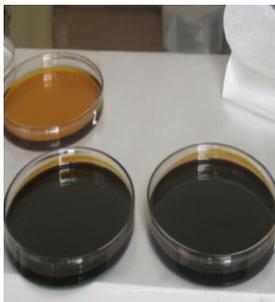


Fig.13 Demostración de la presencia de alcaloides mediante diversos reactivos en el extracto

Anexo 3.

Determinación de la densidad mineral ósea en ratas mediante absorciómetro de rayos X de doble energía (Hologic QDR-2000)



Anexo 4. Extracción de sangre por punción cardiaca bajo anestesia con éter etílico



Anexo 5 Valores mostrados como Media \pm Desviación estándar (DE) sometidos a la prueba de Tukey para estimar las diferencias significativas entre los grupos.

Densitometría ósea

		N	Media	Desviación estándar
Densitometría ósea del fémur	Control	10	0,2371	0,0158
	Sham**	8	0,2512	0,0150
	Estrógeno**	10	0,2458	0,0127
	Maca 0,75g	10	0,2377	0,0113
	Maca 1g	10	0,2211	0,0161
Densitometría de las vértebras lumbares	Control	10	0,3028	0,0111
	Sham	8	0,3007	0,0168
	Estrógeno	10	0,2964	0,0109
	Maca 0,75g	10	0,2947	0,0124
	Maca 1g	10	0,3107	0,0224
Densitometría ósea neta	Control	10	0,2781	0,0093
	Sham	8	0,2837	0,0132
	Estrógeno	10	0,2790	0,0096
	Maca 0,75g	10	0,2742	0,0106
	Maca 1g	10	0,2747	0,0167

** Diferencias significativas del grupo SHAM y el grupo ESTRÓGENO frente al tratamiento con Maca a la concentración de 1g/ml para un valor p de significancia $> 0,05$.

Valores mostrados como Media \pm Desviación estándar (DE) sometidos a la prueba de Tukey para estimar las diferencias significativas entre los grupos.

Parámetros bioquímicos de remodelado óseo

Fosfatasa alcalina	Control	8	128,875	36,0136
	Sham	6	136,333	25,0093
	Estrógeno	9	125,889	24,5278
	Maca 0,75g	9	131,000	27,7128
	Maca 1g	10	141,900	33,5806
Telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1 (NTX)	Control	8	14,171	3,5184
	Sham	6	10,235	2,3388
	Estrógeno	9	13,759	4,2348
	Maca 0,75g	9	13,422	3,1882
	Maca 1g	10	12,700	3,1098
Osteocalcina	Control	8	33,625	11,4144
	Sham	6	41,883	7,8257
	Estrógeno	9	35,636	10,9750
	Maca 0,75g	9	38,578	10,4033
	Maca 1g	10	32,552	7,5366
Estradiol	Control	8	49,813	11,9711
	Sham	6	39,117	7,1943
	Estrógeno	9	38,744	18,9524
	Maca 0,75g	9	39,800	15,0122
	Maca 1g	10	50,940	20,5063

Calcio	Control	8	9,263	0,3815
	Sham	6	8,850	0,7842
	Estrógeno	9	9,056	0,6876
	Maca 0,75g	9	8,933	1,0198
	Maca 1g	10	9,032	0,7394
Fósforo	Control	8	3,338	0,5012
	Sham	6	3,283	0,5115
	Estrógeno	9	3,744	0,6729
	Maca 0,75g	9	3,756	0,4362
	Maca 1g	10	3,780	0,5594

** Diferencias significativas del grupo ESTRÓGENO frente al grupo CONTROL, para un valor p de significancia > 0,05.

Determinación del tipo de distribución muestral.

Acorde con los datos obtenidos por los procedimientos experimentales, los datos muestran un tipo de distribución normal para cada variable analizada mediante la prueba de Kolmogorov Smirnov.

Prueba de Kolmogorov-Smirnov para una muestra

	N	Z de K-S	Sig. asintót. (bilateral)
Densitometría ósea del fémur	48	0,808	0,531
Densitometría ósea de la médula ósea	48	0,731	0,659
Densitometría ósea neta	48	0,631	0,821
Fosfatasa alcalina	42	1,067	0,205
Telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1	42	0,466	0,982
Osteocalcina	42	0,794	0,554
Calcio	42	0,738	0,647
Fósforo	42	0,734	0,654
Estradiol	42	1,218	0,103

Análisis de la homogeneidad de varianzas.

El estadístico de Levene muestra que las varianzas son homogéneas debido a que la significancia estadística es superior al valor límite de 0,05 para todas las variables analizadas.

Prueba de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	Sig.
Densitometría ósea del fémur	0,451	0,771
Densitometría ósea de la médula ósea	1,875	0,132
Densitometría ósea neta	0,739	0,570
Fosfatasa alcalina	0,477	0,753
Telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1	0,570	0,686
Osteocalcina	0,601	0,665
Calcio	1,734	0,163
Fósforo	0,329	0,857
Estradiol	0,712	0,589

ANOVA para los grupos de tratamiento según cada variable estudiada.

Acorde con lo obtenido por la parte experimental, las variables que muestran diferencias significativas de medias entre los grupos son:

- Densitometría ósea del fémur.
- Prueba C reactiva.

ANOVA de un factor

	F	Sig.
Densitometría ósea del fémur	5,959	0,001
Densitometría ósea de la médula ósea	1,680	0,172
Densitometría ósea neta	0,880	0,484
Fosfatasa alcalina	0,412	0,799
Telopéptido N-terminal del colágeno tipo 1	1,402	0,252
Osteocalcina	1,124	0,360
Calcio	0,314	0,867
Fósforo	1,574	0,202
Estradiol	1,239	0,311

Anexo 6.CRONOGRAMA

Actividad		Abril-mayo 2015	Junio – julio 2015	Agosto-setiembre 2015	Octubre-noviembre 2015	Diciembre 2015-marzo 2016	Abril - junio 2016	Julio 2016 ene. 2017
ELABORACION DEL PROYECTO	Búsqueda de Información	■	■					
	Definición del Problema		■	■				
	Marco teórico			■	■			
	Objetivos			■	■			
	Hipótesis				■			
	VARIABLES				■	■		
DISEÑO METODOLÓGICO	Diseño muestral				■	■		
	Preparación de los Instrumentos					■	■	
	Aspectos Administrativos						■	■
	Aspectos Éticos						■	
EJECUCION	Acondicionamiento del Bioterio		■	■	■	■		
	Adquisición de animales				■	■		
	Aclimatación de los animales				■	■		
	Ovarectomización				■	■		
	Frotis Vaginal				■	■		
	Toma de muestras de laboratorio				■	■		
	Administración de Extracto					■	■	
	Densitometría ósea					■		
	Toma de muestras de laboratorio						■	■
	Sacrificio de animales						■	
	Pruebas Histomorfométricas						■	
ANÁLISIS DE RESULTADOS Y ESTUDIOS ESTADÍSTICOS						■	■	
PRESENTACION DEL INFORME FINAL Y SUSTENTACIÓN							■	■

Anexo 7. PRESUPUESTO

El presente proyecto ha sido aprobado por el Vicerrectorado (CON-CON) de Investigación con asignación a la investigación e incentivo al investigador, N°140102321.

BIENES	Costo(s/.)
Adaptación del Bioterio	50
Ratas (60)	600
Alimento balanceado (ratina) y agua	200
Materiales para el extracto (maca, alcohol)	200
Materiales de limpieza (detergente, lejía, escoba, recogedor, jabón líquido, toalla, tachos, trapeador, etc.)	150
Jaulas, Comederos, bebederos, viruta	250
Termostato, hidrómetro y balanza	150
Calefactor	150
Material de Laboratorio (guantes, mascarilla, probetas, jeringas desechables	50
Materiales para la preservación de muestras (frascos, formol, suero)	150
Materiales de primeros auxilios (extintor, botiquín)	50
Subtotal	2,000
SERVICIOS	
Análisis bioquímico	2,700
Museo de historia natural (validación de la planta)	80
Proceso y obtención de muestras biológicas	200
Análisis densitométricos	1,820
Gastos de Fotografía	900
Movilidad	200
Llamadas telefónicas	100
Subtotal	6,000
TOTAL	8000