

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA



Efecto del extracto atomizado de *Lepidium meyenii* (maca negra) en la memoria en ratones machos.

Diana Elizabeth Alcántara Zapata

Tesis para optar el Título de Licenciada en Biología

LIMA – PERÚ

2009

MEMBRANAS DEL JURADO

Presidente: Dr. Alfonso Zavaleta
Vocal: Magister Marcelo Vidal
Secretario: Lic. Juan Luis Macaranga

ASESOR:
Dr. Gustavo F. Gonzáles Rengifo

MIEMBROS DEL JURADO:

Presidente: Dr. Alfonso Zavaleta
Vocal: Magister. Marcela Vidal
Secretario: Lc. José Luis Marcalupú

DEDICATORIA

**A Dios por permitirme seguir una carrera.
en la que sólo El es el único autor**

**A mis Padres y hermanos por su amor,
estimulación y apoyo incondicional**

AGRADECIMIENTOS

- **Al Dr. Gustavo Gonzáles Rengifo por su asesoría constante en este trabajo de investigación, por facilitarme desde un principio los materiales y las instalaciones del Laboratorio que él dirige.**
- **A todos los miembros del Laboratorio de Endocrinología y Reproducción, en especial a quienes colaboraron directamente en este trabajo: Julio Rubio, Sandra Yucra, Vilma Tapia.**
- **Al personal que labora en el Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, dirigido por el Sr. Pablo Núñez, por su apoyo y asesoría en el manejo de ratones Swiss.**
- **A mis admiradas profesoras: Gilma Fernández, Margarita Arana, Nelly Medina, Graciela Untiveros y Luz Marina Pacheco, por sus enseñanzas, consejos y apoyo desinteresado.**
- **A mis queridas amigas y compañeras de estudios: Angela Manrique, Jheny Marticorena, Ivon Chion, Betsy Enriquez y Melissa Herrera por su compañía, amistad y estímulo.**
- **A Pedro Isaías Flórez Chumpitaz por su apoyo y comprensión en todo este tiempo.**

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCION.....	3
II. MARCO TEORICO	
II.i Antecedentes.....	6
II.ii Memoria y Aprendizaje.....	7
II.iii Testosterona en la Función cognitiva	9
II. iv Memoria Espacial Visual	10
II.iv <i>Lepidium mellenii</i> (Maca negra)	11
II.vi Ubicación taxonómica	12
II.vii Descripción botánica	13
II.viii Composición bromatológica y fitoquímica	13
II.ix Usos biofarmacológicos	15
III. OBJETIVOS.....	16
IV. MATERIALES Y METODOS	
IV. i Diseño experimental	17
IV. ii Preparación del extracto atomizado	17
IV. iii Tratamiento	18
IV. iv Dosis	19
IV.v. Animales	20
IV. vi Orquidectomía (Castración)	21
IV. vii Evaluación de la MEV: Prueba Morris Maze.	22
IV. viii Análisis Estadístico.	24

V. RESULTADOS	
V-i Efecto de la Castración y del tratamiento del extracto atomizado de <i>Lepidium meyenii</i> en el peso corporal	25
V-ii Efecto del extracto atomizado de <i>Lepidium meyenii</i> en la memoria Espacial Visual – Prueba de nado Morris maze	27
VI. DISCUSIÓN	30
VII. CONCLUSIONES	36
VIII. RECOMENDACIONES	37
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	38
X. ANEXOS	47

RESUMEN

La memoria y el aprendizaje son procesos que se ven afectados en la etapa de envejecimiento. Las alternativas terapéuticas como el uso de plantas utilizadas tradicionalmente para este tipo de deficiencias presentan en la actualidad un mayor auge.

La maca es usada tradicionalmente por sus diferentes y favorables propiedades alimenticias y reproductivas. Pero se conoce poco, desde el punto de vista tradicional, sobre el efecto en la memoria y el aprendizaje.

Este estudio tuvo como propósito evaluar el efecto del Extracto atomizado de Maca Negra en la Memoria Espacial Visual (MEV) utilizando la prueba de Morris maze, en ratones machos.

El tratamiento con el extracto de maca negra se inició siete días después de la cirugía. La dosis de extracto atomizado de Maca Negra administrada fue equivalente a 1g de hipocótilo seco/kg de peso corporal.

Los resultados obtenidos demuestran que el extracto atomizado de Maca Negra potencia la Memoria Espacial Visual (MEV) disminuyendo el tiempo de latencia de escape. Además debe realizarse estudios a nivel molecular para determinar el mecanismo de acción de los metabolitos presentes en la maca en la memoria.

Palabras Clave: *Lepidium meyenii*, Maca Negra, extracto atomizado, Water Finding Task, Aprendizaje Latente, Memoria Espacial Visual, Castración.

ABSTRACT

Memory and learning are processes affected during aging. It is increased interest for the use of Alternative medicine to improve memory and learning.

Maca is a plant belonging to the Brassicaceae (Crucifer) family and it's a native plant from the Central Peruvian highlands. Maca is a hypocotyl growing exclusively between 4000 and 4500 m altitude in the, particularly in Bombon place and is used traditionally by its nutritional and fertility enhancing proprieties.

This study aimed to evaluate the effect of extract of Black Maca which were spray-dried in the Visual Spatial Memory (VSM) using the Morris maze test, in male mice.

Treatment with the maca extract started seven days after surgery. The dose of administered of atomized Black Maca was equivalent to 1 g dry hypocotyls per kg body weight.

The results show that atomized Black Maca extract enhances Visual Spatial Memory (MEV) reducing latency of escape. Specific studies could be performed at the molecular level to determine the mechanism of action of the metabolites present in Maca for the memory.

Key words: *Lepidium meyenii*, Black Maca, Morris Maze test, Visual Spatial Memory, Water Finding Task, Latent learning, Castration.

I. INTRODUCCION

Muchas funciones cognitivas se deterioran con la edad. Si tomamos en cuenta que en el mundo la esperanza de vida se ha incrementado en las últimas décadas, y que la población, tanto de hombres como mujeres, demanda una mejor calidad de vida, los procesos fisiológicos primordiales del ser humano, como es el aprendizaje y la memoria, deben encontrarse siempre en óptimas condiciones.

El aprendizaje y la memoria son dos procesos cerebrales estrechamente ligados que originan cambios adaptativos en el comportamiento de los organismos. (38)

El mantenimiento de los elementos neurales en los sistemas cerebrales que soportan la memoria, tales como la formación de sinapsis en la corteza prefrontal y el hipocampo, son críticos en la etapa de envejecimiento (11). La pérdida de la memoria de trabajo y de largo plazo son características en enfermedades neurodegenerativas. (23). Además el hipocampo sufre cambios bioquímicos y estructurales (11), que pueden llegar ser tan severas como en los observados en la enfermedad de Alzheimer.

En modelos animales con roedores y primates, se ha visto que la privación de andrógenos causa importante pérdida de sinapsis en el hipocampo, causando cambios en la neurotransmisión de la corteza prefrontal. (23); debido a los andrógenos actúan en estas áreas produciendo efectos en los receptores de catecolaminas, GABA, y serotonina. (28)

De otro lado, la terapia de reemplazo hormonal mejora el déficit de andrógenos en hombres en edad avanzada (3; 54; 36; 21). Sin embargo los costos de esta terapia pueden limitar su uso.

Ante esta situación, las alternativas terapéuticas, como la medicina tradicional, cobran mayor importancia (31; 42; 43; 59). Se han encontrado plantas que presentan compuestos, como los fitoestrógenos, que pueden revertir los efectos del envejecimiento, mejorando la memoria y el aprendizaje (37; 32; 26).

El Perú cuenta con una amplia gama de plantas medicinales que aún no han sido bien estudiadas científicamente (59). Muchas de estas plantas crecen en zonas altoandinas y vienen siendo consumidas por los pobladores de estas zonas, hace cientos de años (57).

Lepidium meyenii (Maca Negra) es una planta la cual entre sus propiedades se le atribuye principalmente el incremento de la fertilidad (6; 18). Además presenta compuestos fitoquímicos (34; 45); como los fitoestrógenos (1).

Recientes estudios (12-19) además, han comprobado que mejora el déficit de memoria inducido por escopolamina en ratones, utilizándose los extractos hidroalcohólico y acuoso de Maca Negra (51) y también mejora el Aprendizaje Latente y disminuye el Stress en ratonas ovariectomizadas (OVX) encontrándose que la Maca Negra tiene el mejor efecto; (50) Estos efectos no se aprecian con otras variedades de maca, como la roja y la amarilla.

Sin embargo aún no se ha evaluado cuál es el efecto del extracto atomizado de *Lepidium meyenii* (Maca Negra) en la función cognitiva de ratones machos con deficiencia de Testosterona, como modelo de envejecimiento, por medio de castración.

II. MARCO TEÓRICO

II.i. Antecedentes

Con respecto a la memoria y aprendizaje, se han descrito muchas plantas y productos naturales en la medicina tradicional que poseen propiedades medicinales, pero pocas han sido estudiadas científicamente (59).

Por ejemplo se sabe que las bayas liofilizadas de *Vaccinium* (arándano), aumentan significativamente la memoria a Corto plazo, pero no a largo plazo en la tarea de "Inhibitory Avoidance" (prueba que consiste en condicionar al animal a permanecer en un solo lugar del aparato) (47) previniendo el déficit de memoria.

Otro ejemplo es el aceite de pescado Menhaden (FO) que promueve y mejora la memoria espacial visual en crías de ratas. (8). También se ha evaluado el efecto de isoflavonas de soja, específicamente en la función cognitiva: aprendizaje y memoria, y sus efectos beneficiosos en las enfermedades neurodegenerativas, y sobre la expresión de las proteínas implicadas en la protección neuronal en ratas. (37)

Por otro lado estudios epidemiológicos sugieren que las dietas con un alto contenido de verduras y frutas se asocia a una mejor función cognitiva en ancianos, pudiendo reducir la incidencia de los trastornos degenerativos, incluyéndose la enfermedad de Alzheimer (43; 32)

Otros estudios sugieren que los extractos fitoquímicos son beneficiosos, porque podrían invertir el curso del envejecimiento neuronal y cognitivo. (26) y que la inclusión de fitoestrógenos en la dieta de roedores, influye favorablemente en la Memoria Espacial Visual (MEV). (37).

La Maca Negra (*Lepidium meyenii*) tiene efectos beneficiosos en el aprendizaje Latente en ratonas ovariectomizadas (OVX) reduciendo la latencia de bebida (50) y mejorando el déficit de memoria inducida por escopolamina (51)

II.ii. Memoria

La memoria y el aprendizaje son procesos cognoscitivos, activos y complejos que se encuentran presentes en procesos cerebrales como la percepción sensorial (38) y que permiten que la información sea tratada de modos diferentes, ya sea incorporándola, codificándola o almacenándola en el cerebro a fin de que pueda ser utilizada en determinadas circunstancias.

El aprendizaje constituye junto con las fuerzas selectivas de la evolución, el modo principal de adaptación de los seres vivos. Implica un cambio en el sistema nervioso que resulta de la experiencia, y que origina cambios duraderos en la conducta de los organismos. (38)

La Memoria es un proceso en el cual lo que aprendemos es retenido o almacenado en el cerebro. (58). Se procesa la información incorporándola, codificándola, almacenándola en el cerebro y después recuperándola. (39).

En el aprendizaje se producen cambios en la potencia de las conexiones sinápticas entre las neuronas interconectadas de manera específica. Es decir, el programa de desarrollo de cada organismo prevé determinadas conexiones entre neuronas y la experiencia altera la fuerza y la eficacia de dichas conexiones químicas preexistentes. (82)

La serotonina actúa como modulador para incrementar la liberación de glutamato en la terminal presináptica de la neurona sensorial. Para ello la serotonina, como primer mensajero, actúa sobre un receptor de serotonina transmembrana que activa la enzima Adenil Ciclasa (AC), la cual desencadena la formación del AMP cíclico. El AMPc es un segundo mensajero, que difunde la señal proveniente de la membrana celular hacia el interior de la célula, activa a la Proteína Quinasa A (PKA) que aumenta la liberación de glutamato en la terminal del axón mediante una combinación de mecanismos de fosforilación (de los canales iónicos y de la exocitosis) (82), produciéndose así la cascada de señalizaciones en el proceso de aprendizaje.

II.iii. Testosterona en la función cognitiva

Los andrógenos están involucrados en procesos nemotécnicos (24). Estudios realizados con humanos han caracterizado el impacto de la privación androgénica y la subsiguiente terapia con estradiol en la memoria a largo plazo, en pacientes con cáncer de próstata. (3); Su reemplazo tiene efectos positivos en procesos cognoscitivos específicos en personas de edad (3), pudiendo desempeñar un papel neuroprotector contra el deterioro de las funciones cognitivas (Halbreich y col.; 1995) como en las tareas de aprendizaje y memoria (37).

La suplementación con testosterona beneficia selectivamente la función cognitiva en hombres con enfermedad de Alzheimer y otras degeneraciones cognitivas.(54; 37); además altera la actividad neural esencial para el aprendizaje y memoria (23).

Estudios anteriores han demostrado que la densidad de las espinas dendríticas en la región CA1 de hipocampo es modulada positivamente por la testosterona (33)

Si bien es cierto que la testosterona no es una hormona que se encuentre involucrada directamente en los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria, sí influye en ellos cuando sus niveles séricos normales disminuyen, ya que no se produce la conversión a estradiol (3; 24).

II.iv. Memoria Espacial Visual

La Memoria espacial Visual (MEV) es un tipo de cognición dependiente de hormonas gonadales que se encuentra especialmente influenciada por las hormonas gonadales. (35; 37) específicamente por los estrógenos (36) alterando la estructura y función neuronal en varias regiones del cerebro (54). Radica en las regiones cerebrales que procesan la información sensorial y motora, como el hipocampo y la corteza frontal. (37); y está influenciada por características propias del animal de experimentación como: sexo, especie / cepa, edad, estado nutricional, exposición al estrés o infección; y la disposición de las figuras (11).

En este tipo de Memoria la tarea de recuperación de imágenes requiere de la recuperación de información de la Memoria a Largo plazo, generación de la imagen visual en la memoria de trabajo y la utilización de la información para una decisión (38). La tarea de mantenimiento de imagen requiere sólo los dos últimos procesos. La demandas del procesamiento de información requerida por las tareas de exploración y rotación provino de la necesidad de transformar la imagen visual de manera que pueda ser usada en la toma de decisiones. (46). Todos estos procesos se encuentran comandados por una cascada de neurotransmisores (GABA, Ach, dopamina, serotonina) y segundos mensajeros (56).

El Morris Maze se ha utilizado para evaluar funciones cognitivas en ratas por efecto de la melatonina en el estrés oxidativo en la memoria espacial (20), comportamiento en diferentes fases del ciclo estral (60); rendimiento de la MEV

en ratas machos insensibles a andrógenos. (25), para medir el efecto de extractos hidroalcolicos en modelos de amnesia en ratones. (29) y para demostrar el efecto a largo plazo de diferentes extractos de frutas y vegetales en la función cognitiva (26).

II.vi. *Lepidium meyenii* (Maca)

Generalidades:

Lepidium meyenii (Maca) es una Brassicaceae que crece exclusivamente entre los 4000 y 4500 m sobre el nivel del mar en los Andes centrales, y es una planta usada tradicionalmente en la medicina folclórica por las culturas indígenas en Perú, registrado desde el siglo XVII.(59). Específicamente el hipocótilo ha sido empleado por sus propiedades, tanto como energizante como en el incremento de la fertilidad (6; 19-26).

La Maca habría sido domesticada por grupos humanos provenientes de la selva peruana denominados "Pumpush", que poblaron zonas como Cuncush Runa en la meseta de Bumbush o Bombón, en la que se ubica la laguna de Chinchaycocha o Junín. Las plantas ancestrales de la Maca habría sido una de sus fuentes de alimento y el proceso de su domesticación se habría iniciado 1200 años antes de Cristo en los alrededores de San Blas. (60).

En el Departamento de Junín (Carhuamayo) se han descrito 13 variedades de Maca diferenciándose por sus colores los cuales se encuentran desde el blanco hasta el negro. La variedad de Maca encontrada con mas frecuencia en la región es la de color amarillo (47.8%), siendo la mas preferida comercialmente. (73)

Hasta hace pocos años, la distribución geográfica de la maca ha estado restringida a los alrededores de la laguna de Junín, en la sierra central del Perú. Tradicionalmente las grandes áreas de cultivo se encontraban en el Departamento de Junín, en muchas comunidades de los distritos de Ondores, Huayre, Carhuamayo, Tarma y Junín; y en el Departamento de Pasco en Ninacaca, Yanachachi y Vicco. Recientemente su cultivo se está extendiendo a otros departamentos como Huancavelica y Ayacucho. Todas estas localidades están ubicadas en las zonas agroecológicas Suni y Puna, con una elevación entre los 3500 y 4500 m.s.n.m.

II.vii. Ubicación Taxonómica:

Esta clasificación taxonómica fue basada según Cronquist (1981):

DIVISION	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnolipsida (Dicotiledoneas)
SUBCLASE IV	:	Dilleniidae
ORDEN	:	Capparales
FAMILIA	:	Brassicaceae
GENERO	:	Lepidium
ESPECIE	:	<i>Lepidium meyenii</i> Walpers.
NOMBRE VERNACULAR	:	“Maca”, “maka”, “maino”, “maca-maca”, “Ayak willku”, “ayak chichita”

II.viii. Descripción Botánica:

Lepidium meyenii Walp es una planta herbácea y se caracteriza por la formación de una roseta de tallos cortos y decumbentes con numerosas hojas y que crece casi pegada al suelo, lo que le confiere una gran tolerancia a heladas. Dentro del suelo la parte del tallo que se encuentra debajo de los cotiledones (hipocótilo) adquiere una estructura carnosa que se integra con el tejido radicular y termina en una raíz gruesa con numerosas raíces laterales absorbentes. Este hipocótilo- raíz es tuberoso, succulento y en forma de rábano y es la parte comestible. Los cultivares de *Lepidium meyenii* Walp. (Maca) que existen en la actualidad se diferencian mayormente por el color de los hipocótilos-raíces. Las hojas muestran dimorfismo, siendo más largas en la fase vegetativa y más reducida en la fase reproductiva. Las flores son poco notables, con 4 sépalos y cuatro pétalos blancos y pequeños, con dos o tres estambres. El ovario es ovalado y bicarpelar con estilo corto. Las flores están agrupadas en racimos axilares. El fruto es una silicua con dos semillas. (59)

II.ix. Composición Bromatológica y fitoquímica

El resultado del análisis químico bromatológico de la Maca negra deshidratada, reportado por Dini y col (1994) fue: 7.7% de proteínas, 63.82% de carbohidratos, 2.2 % de lípidos, 38.18 % de almidón, 4.95 % de fibra. Ácidos grasos libres como el ácido linoleico, palmítico y oleico estuvieron presentes en un 52.7%.

La maca contiene también aminoácidos (mg/gr. proteína) como leucina (91.0 mg), arginina (99.4 mg), fenilalanina (55.3 mg), lisina (54.3 mg), glicina (68.30 mg) alanina (63.1 mg) valina (79.3 mg), isoleucina (47.4 mg), ácido glutámico (156.5 mg) serina (50.4 mg) y ácido aspártico (91.7 mg). Otros aminoácidos presentes pero en menor proporción son la histidina (21.9 mg), treonina (33.1mg), tirosina(30.6 mg), metionina (28mg), hidroxiprolina (26 mg), prolina (0.5 mg) y sarcosina (0.70 mg). Minerales como Potasio 1000 mg % y hierro 86 (ppm) (13)

Además la maca presenta glucosinolatos aromáticos, en la que el principal metabolito parece ser el bencilglucosinolato (14)

Sandoval y colaboradores (2002) demostraron que la Maca tiene capacidad de remover radicales libres y proteger a las células del stress oxidativo. Estos autores sugieren que la maca podría mantener el balance entre oxidantes y antioxidantes reaccionando con los oxidantes y radicales libres, y protegiendo a las células contra el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Entre otros compuestos presentes en los hipocótilos de la maca se encuentran la uridina y el ácido málico (45). Igualmente se ha descrito en la maca la presencia de prostaglandinas (13), flavonoides (79) y antocianinas (83).

II.x. Usos Bio-Farmacológicos

De acuerdo con la literatura científica la maca es un alimento que tiene un bajo grado de toxicidad oral en el tratamiento agudo con animales, y baja toxicidad celular *in vitro* (59)

Cabe resaltar que los hipocótilos de Maca se presentan en diferentes cultivares. Esto depende del color externo, además los efectos biológicos son diferentes. (18).

En modelos animales, particularmente ratas, se ha demostrado que la administración oral de maca (*Lepidium meyenii*) en el tratamiento agudo y crónico mejora de forma considerable los parámetros sexuales (6), incrementa la actividad afrodisíaca (62) y activa la espermatogénesis (extracto alcohólico) (15). Además, el extracto acuoso de maca, tiene actividad antioxidante (68) y previene la pérdida de la masa ósea causada por deficiencia de estrógenos. (80). También reduce la depresión y la ansiedad en varones (26) y mejora la producción y la motilidad de espermatozoides (22).

III. OBJETIVOS

III.i. Objetivos Generales:

- Evaluar el efecto del extracto atomizado de *Lepidium meyenii* en la Memoria en ratones.

III.ii. Objetivos Específicos:

- Evaluar el peso corporal de los ratones después de 50 días de administración del extracto atomizado de *Lepidium meyenii*.
- Evaluar el efecto del extracto atomizado de *Lepidium meyenii* después de 50 días de tratamiento en la Memoria Espacial Visual en ratones.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. i. Diseño Experimental.

Se utilizaron en total 61 ratones machos de dos meses y medio de edad.

La Memoria Espacial Visual fue evaluada con la prueba de nado de Morris después de 50 días de tratamiento, durante 5 días, desde las 10 am hasta las 5 pm, tres veces por día.

Previo al tratamiento 25 animales fueron sometidos a orquidectomía.

Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a lo aceptado y aprobado por el Comité de Ética en animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia basado en normas internacionales (52)

IV. ii. Preparación del Extracto Atomizado de *Lepidium meyenii*

Lepidium meyenii maca del cultivar negro, fue obtenido de la ciudad de Ninacaca - Pasco – Perú a 4140 m de altitud, y conservado a 0 °C. No se utilizó pesticidas para su crecimiento y producción.

El secado se realizó bajo corriente de aire en la misma ciudad de Ninacaca (sin exposición al sol y bajo sombra)

Se utilizaron 500g de hipocótilos secos y pulverizados realizándose posteriormente una extracción etanólica con alcohol etílico al 70% durante 72 horas y luego fueron atomizados por un proceso convencional. Posteriormente se conservó en refrigeración a - 4 °C.

IV. iii. Tratamiento

El tratamiento se realizó durante 55 días con el extracto hidroalcohólico atomizado de *Lepidium meyenii* (MN) y el vehículo (agua destilada), administrado con una sonda oro-gástrica N° 18 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania).

La dosis administrada fue el equivalente de 1g de hipocótilo seco de MN* /Kg de peso corporal que se administró vía sonda orogástrica en 0.5 ml diariamente, similar a un estudio realizado por Rubio (2006). El grupo control recibió agua destilada. El tratamiento con MN o agua destilada se inició 2 semanas después de la cirugía.

MN : Maca Negra.
MEV : Memoria Espacial Visual.
CTX : Castrados.
SHAM : Ratones pseudo perados.

IV. iv. Dosis

La dosis se preparó de acuerdo al siguiente cálculo:

Dosis de hipocótulo seco de Maca Negra (MN) = 1 g MN/1Kg de peso.

Entonces:

$$\begin{array}{l} 1\text{g. hipocótulo seco de MN} \text{ ----- } 1000 \text{ g. Peso corporal} \\ X \text{ ----- } 30 \text{ gr. Peso corp. prom} \\ X= 0.030 \text{ g. MN hipocótulo seco,} \\ \text{para un animal de 30 g de peso corporal.} \end{array}$$

En el proceso de atomización del hipocótulo seco de Maca Negra se obtuvo que:

$$1 \text{ g MN hipocótulo seco} \text{ ----- } 0.1338 \text{ g. MN atomizada.}$$

Por lo tanto en lo administrado para un animal de 30 g de peso se calculó de la siguiente manera:

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g MN hipocótulo seco} \text{ ----- } 0.1338 \text{ g. MN atomizada.} \\ 0.030 \text{ g. MN hipocótulo seco} \text{ ----- } X \end{array}$$

$$X= 0.004014 \text{ g de MN atomizada que recibió cada animal de 30 g de peso corporal promedio.}$$

La administración de esta dosis de MN atomizada fue disuelto en agua destilada, cuyo volumen fue 0.5 ml por vía oral.

MN : Maca Negra.
MEV : Memoria Espacial Visual.
CTX : Castrados.
SHAM : Ratonés pseudo perados.

IV.v. Animales

Se utilizaron 61 ratones machos de dos meses y medio de edad, de la cepa Swiss, cuyos pesos fluctuaban entre 30g y 34g que fueron obtenidos del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia y mantenidos en un medio con 12 h luz/12 h oscuridad, temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; alimentación balanceada y agua *ad libitum*.

Basado en un estudio similar (66) se consideraron como mínimo 6 animales por grupo.

Para evaluar el peso corporal antes y después de tratamiento los animales fueron agrupados en 4 grupos:

- Sham MN¹
- Sham
- Castrado MN
- Castrado

Los grupos evaluados para la Memoria Espacial Visual fueron 5:

- Castrados con Maca Negra (MN)
- Castrados sin tratamiento
- Sham con Maca Negra (MN)
- Sham sin tratamiento
- Sin Operar

El número de animales obtenidos inicialmente fue de 70. Sin embargo, durante el mantenimiento de estos animales el número disminuyó debido a factores como: tumores, canibalismo y fuga antes del tratamiento. La cirugía sólo produjo la pérdida de 3 animales. Por esa razón, los grupos no presentaron un número homogéneo de individuos.

IV.vi. Castración – Orquidectomía

En el estudio se realizó orquidectomía a 25 ratones, debido a que, de acuerdo con la literatura, es uno de los modelos más usados *in vivo* para producir los efectos pato fisiológicos andropaúsicos (48). Por lo tanto, la castración permitiría que se evidenciaran estos efectos (33; 32).

Los ratones fueron anestesiados con una dosis de 40 mg/Kg de Halatal (vía intraperitoneal) y 0.5 ml de Lidocaína (vía subcutánea). Una vez anestesiado el animal se procedió a hacer una incisión en la parte inferior ventral extrayendo los testículos (sin epidídimo), previa sutura de la arteria. Se cosió el músculo, la capa subcutánea y luego la piel. En el grupo Sham sólo se realizó una incisión e inmediatamente se realizó el cierre. Se limpió la zona de la cirugía con alcohol yodado y se aplicó una crema antibiótica. Se dejó recuperar al animal durante 24 horas antes de colocarlo en su respectiva jaula.

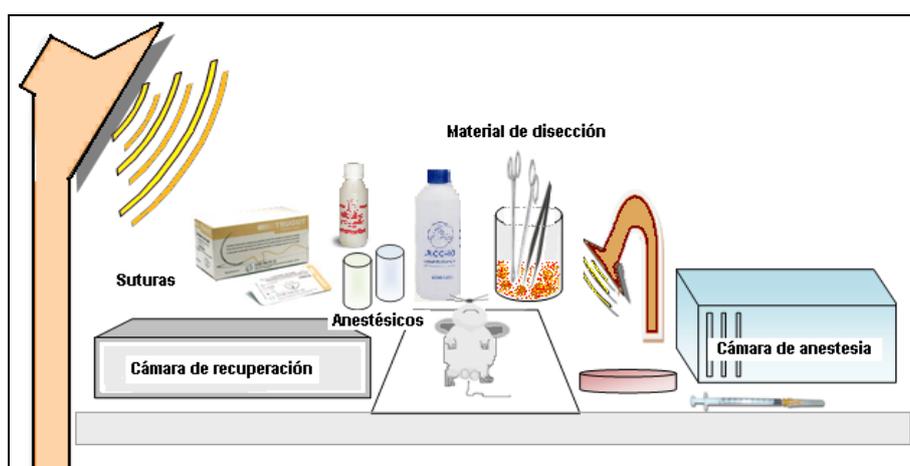


Ilustración 1: Orquidectomía

IV.vii. Evaluación de la Memoria Espacial Visual (MEV): Prueba Morris Maze.

Se aplicó esta prueba a 61 ratones. Los ratones fueron colocados en la piscina durante cinco días, de acuerdo con la metodología descrita (51).

Esta prueba para ratones, fue adaptada del paradigma original descrito por Morris (51). Se realizó en una piscina circular de color negro (65 cm de diámetro, 45 cm de alto) llena de agua cubriendo, por encima de 1 cm, a la plataforma de escape (6 cm de diámetro y 24 cm de alto). La piscina fue dividida en 4 cuadrantes imaginarios y en uno de los cuadrantes se colocó la plataforma de escape. La plataforma provee al ratón el único lugar de escape dentro de la piscina y estuvo colocada en el mismo cuadrante durante todos los días que duró la prueba.

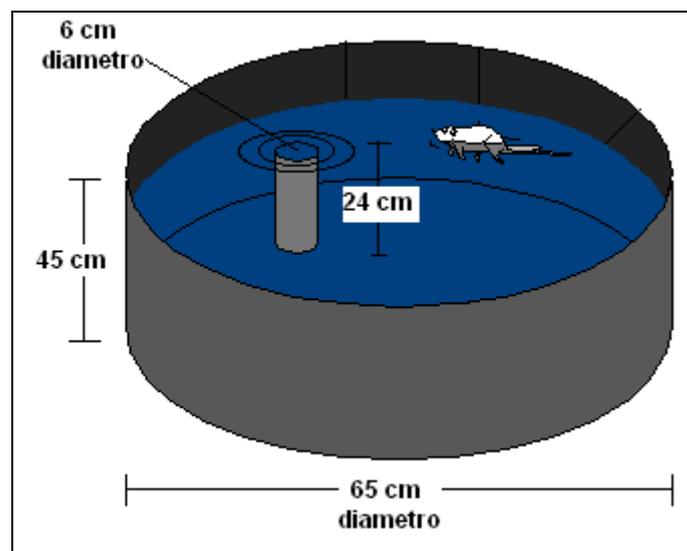


Ilustración 3: Morris Maze

La temperatura del agua fluctuaba entre $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$, a la cual se le agregó colorante vegetal azul (colorante inocuo Elyazan S. A. Autorización Sanitaria S25013N NAEYSA DIGESA R. I. 15-225-49-G.). Las figuras colocadas alrededor de la piscina fueron estáticas: Triángulo verde, Círculo azul, Cuadrado rojo.

Tres diferentes puntos de inicio alrededor del perímetro de la piscina fueron asignados para los tres entrenamientos diarios por cada ratón. Se realizaron tres pruebas por día durante 5 días consecutivos; en cada uno de los cinco días de prueba todos los puntos de inicio fueron aleatorios. Los objetos y/o imágenes que se encontraban en la habitación, donde se realizó la evaluación, no fueron cambiados. Todos los entrenamientos, para esta prueba, fueron realizados por el mismo investigador y a la misma hora (entre las 10:00am y 5:00pm.)

Las pruebas empezaron colocando al animal en el agua mirando la pared de la piscina en cualquiera de los puntos de inicio. Si el animal no llegaba a la plataforma dentro de 120 segundos era colocado suavemente sobre la plataforma por 15 segundos. El intervalo entre cada ensayo para el mismo ratón fue de 5 a 10 minutos.

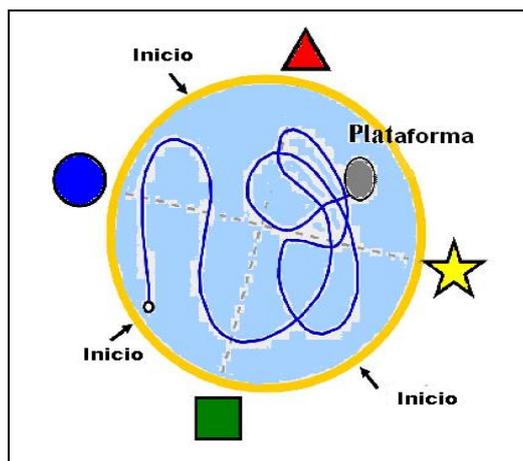


Ilustración 4

La memoria espacial se midió con la variable Latencia de Escape (que es el tiempo en segundos que demora el ratón en llegar a la plataforma).

IV.viii. Análisis Estadístico

El análisis se realizó utilizando el programa estadístico SPSS (versión12).

Los resultados fueron mostrados como la Media \pm Error Estándar. Las variables fueron analizadas por análisis de varianza (ANOVA) de un factor. El análisis paramétrico (se conoce la media y desviación estándar de los grupos) para la comparación de medias entre los grupos se realizó con la Prueba T-student. En el ANOVA cuando el valor de $P < 0.05$, era considerado significativo estadísticamente. Cuando el valor de "P" era significativo se procedía al análisis con Post Hoc Scheffé, para determinar entre qué pares de combinación había diferencias.

V. RESULTADOS

V.i. EFECTO DE LA CASTRACIÓN Y DEL TRATAMIENTO CON EXTRACTO ATOMIZADO DE MACA NEGRA EN EL PESO CORPORAL.

TABLA 1: Peso corporal antes y después del experimento. Los datos fueron expresados en gramos (Media \pm ES). n total = 61. SHAM: ratones seudo operados. SHAM MN: ratones Sham tratados con Maca Negra. CTX: ratones Castrados. CTX MN: ratones Castrados y tratados con Maca Negra.

Grupo	Peso Inicial	Peso Final
SHAM (n=19)	30.63 \pm 0.70 ab	32.84 \pm 0.59 *,c
SHAM MN (n=17)	34.12 \pm 0.67	32.88 \pm 0.65 c
CTX (n=14)	30.71 \pm 0.4 ab	30.79 \pm 0.68
CTX MN (n=11)	34.27 \pm 0.52	32.64 \pm 0.74 *

* (p<0.05) con respecto al peso inicial. Número de animales por grupo en paréntesis.

a. P < 0.05 con respecto al grupo CTX MN en el mismo día.

b. P < 0.05 con respecto al grupo SHAM-MN en el mismo día.

c. P < 0.05 con respecto al grupo CTX MN en el mismo día.

Efecto de la Castración.

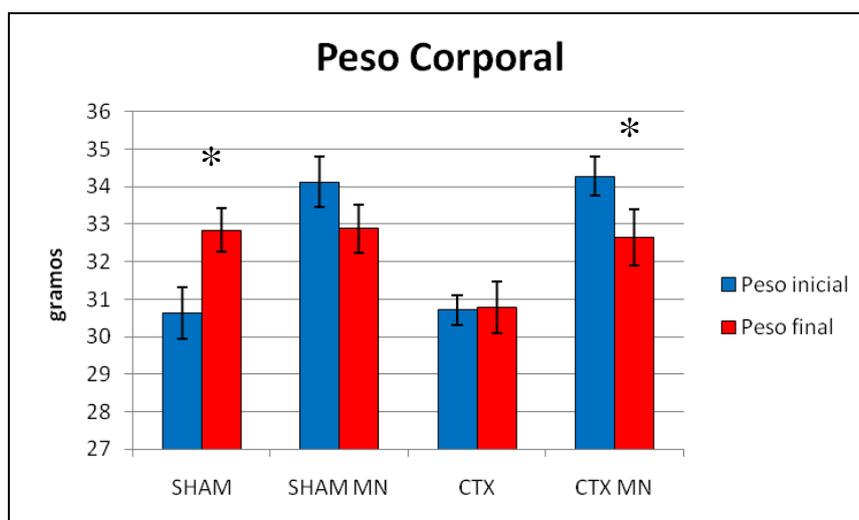
La Castración en el grupo no tratado no varió el peso corporal final con respecto al peso corporal inicial. (Tabla 1).

Efecto del tratamiento con extracto atomizado de Maca Negra.

El tratamiento con extracto atomizado de MN disminuyó el peso corporal final con respecto al peso corporal inicial, tanto en animales normales como en castrados. (p<0.05).

FIGURA 1: Comparación de los pesos corporales de ratones tratados con el Extracto Atomizado de *Lepidium meyenii* (MN) durante 50 días de tratamiento.

Los datos fueron expresados en gramos (Media \pm ES). n = 61. SHAM: ratones seudo operados. SHAM MN: ratones Sham tratados con Maca Negra. CTX: ratones Castrados. CTX MN: ratones Castrados y tratados con Maca Negra.



* ($p < 0.05$) con respecto al peso inicial.

V.v. EFECTO DEL EXTRACTO ATOMIZADO DE MACA NEGRA EN LA MEMORIA ESPACIAL VISUAL (MEV) EN LA PRUEBA DE NADO MORRIS MAZE DURANTE LOS CINCO DIAS DE ENTRENAMIENTO.

TABLA 4: Latencia de Escape en los cinco días de entrenamiento usando Morris Maze. Los datos fueron expresados en tiempo en segundos (Media ± ES; tres pruebas por día). n total = 61. SHAM: ratones seudo operados. SHAM MN: ratones Sham tratados con Maca Negra. CTX: ratones Castrados. CTX MN: ratones Castrados y tratados con Maca Negra.

Grupo \ Día de Ent.	1°	2°	3°	4°	5°
Sin Operar (n=9)	94.389 ± 8.485	*,a, b 44.110 ± 7.881	*, a 40.667 ± 8.269	*	*, a 28.000 ± 6.223
Sham (n=10)	107.967 ± 5.837	*, a,b 40.900 ± 10.424	*,a 29.133 ± 5.158	*,a 29.050 ± 5.193	*,a 27.133 ± 6.344
Sham MN (n=17)	100.069 ± 3.644	*	*,a 38.844 ± 5.898	*,a 30.980 ± 7.293	*,a 21.656 ± 3.387
Castrados (n=14)	101.416 ± 6.106	** 91.738 ± 6.490	** 79.941 ± 10.081	*	*
Castrados MN (n=11)	101.727 ± 6.479	** 77.712 ± 10.181	*,a 49.848 ± 9.684	*	*,a 27.304 ± 9.866

Total de animales que participaron en esta prueba en paréntesis. Tiempo medido en segundos

* p < 0.05 con respecto al 1° día.

** p < 0.05 con respecto al 5° día.

a. P < 0.05 con respecto al grupo Castrados en el mismo día.

b. P < 0.05 con respecto al grupo Castrados MN en el mismo día

En la Tabla 4 se observa que a partir del segundo día de entrenamiento, el tiempo de latencia de escape disminuyó en los animales normoandrogénicos

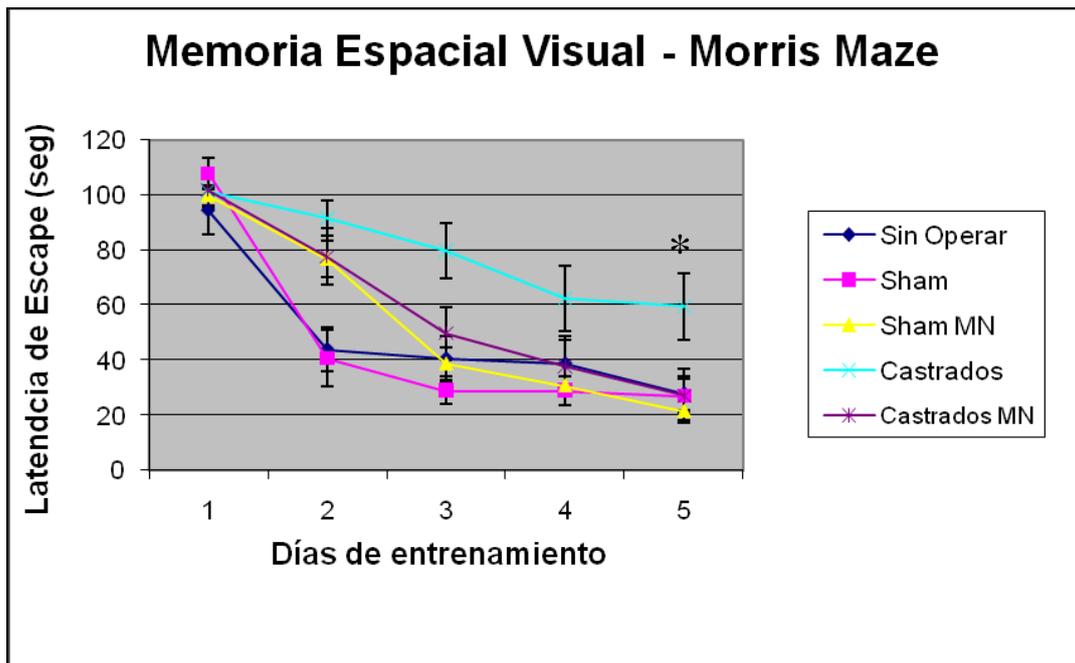
($p < 0.05$); mientras que en los animales andropaúsicos, sucedió a partir del cuarto día ($p < 0.05$).

Como era de esperarse, los grupos No castrados presentaron un menor tiempo en la Latencia de Escape a partir del segundo día de prueba con respecto al primer día ($p < 0.05$).

En el tercer día debía esperarse que los ratones Castrados tuvieran mayor tiempo en la Latencia de Escape que los grupos de ratones que no fueron Castrados, debido a la ausencia de andrógenos. Sin embargo, el tratamiento con Maca Negra permitió que se evidenciara un menor tiempo en la Latencia de Escape con respecto al grupo castrado sin tratamiento ($p < 0.05$), revirtiendo el efecto de la castración y potenciando la Memoria Espacial Visual.

Este efecto fue similar al estudio de Rubio y colaboradores en el 2008 realizado en ratonas OVX, utilizando la misma prueba.

FIGURA 5: Efecto del Extracto Atomizado de *Lepidium meyenii* (MN) en la Latencia de Escape durante los cinco días de entrenamiento. Los datos fueron expresados en tiempo en segundos (Media \pm ES; tres pruebas por día). n total = 61. SHAM: ratones seudo operados. SHAM MN: ratones Sham tratados con Maca Negra. CTX: ratones Castrados. CTX MN: ratones Castrados y tratados con Maca Negra.



*. $p < 0.05$ con respecto a todos los grupos en el quinto día.

En la Figura 5 se observa claramente la tendencia a disminuir, en el tiempo, la Latencia de Escape, en todos los grupos, mientras transcurrían los días de Entrenamiento; exceptuando al grupo Castrado sin tratamiento, que presentó diferencias significativas con respecto a todos los demás grupos, en el quinto día de prueba. ($P < 0.05$). Esto demuestra por lo tanto, que la Maca Negra favorece la Memoria Espacial Visual en ratones deficientes de andrógenos, revirtiendo el efecto de la castración.

VI. DISCUSIÓN

En el presente estudio se ha querido resaltar la importancia de los andrógenos, particularmente en la función cognitiva; cuáles son los efectos de la disminución de andrógenos en los niveles séricos en la etapa de envejecimiento (56) por medio de la castración; además de enfatizar la importancia que tiene la alternativa terapéutica de la medicina tradicional con el uso de plantas con poder curativo para este tipo de deficiencias. (42; 42, 43; 59)

El Perú cuenta con una amplia gama de plantas medicinales que aun no han sido bien estudiadas científicamente (59). Muchas de estas plantas crecen en zonas altoandinas y vienen siendo consumidas por los pobladores de estas zonas, hace cientos de años (57). *Lepidium meyenii* (Maca) es una de ellas; y precisamente esta planta tradicional de los andes peruanos tiene diferentes propiedades terapéuticas. (19-26; 6; 68; 81; 80); y, específicamente en su cultivar Negro ha demostrado que tiene efectos beneficiosos sobre la memoria. (50)

De acuerdo con los resultados (TABLA 1), la Maca Negra no produjo sobrepeso en los grupos tratados. Por el contrario, se observó una disminución en el peso corporal, siendo los resultados significativos para el grupo Castrados tratados con Maca Negra (CTX MN) debido a la ausencia de gónadas, al estrés, o a un efecto de la maca, como se ha observado en la población de Carhuamayo que tradicionalmente cultivan y consumen Maca y

que presenta menor índice de masa corporal que la población que no consume maca. (González GF. Comunicación personal, 2010).

A medida que se realizaba las sesiones de entrenamiento para evaluar la Memoria Espacial Visual, el grupo de animales no castrados (grupo Sham y el grupo Sin operar), relacionaban los objetos y la ubicación específica donde se localizaba la plataforma, permitiéndoles recordar con mayor facilidad, y, mientras transcurrían los días, los animales demoraban menos en llegar a la plataforma como se ha visto en estudios anteriores (70).

Se sabe que la castración afecta la Memoria Espacial Visual deteriorándose la retención (33; 54) debido a la caída de andrógenos (32; 15). Esta caída, produce pérdida de sinapsis en el hipocampo, causando cambios en la neurotransmisión de la corteza prefrontal (32), déficit progresivo de la memoria y aprendizaje, degeneración del sistema nervioso central colinérgico y monoaminérgico, excesivo estrés oxidativo en el cerebro y el desbalance entre diferenciación y apoptosis. (72).

En este experimento, el modelo de castración funcionó como control similar a los resultados que se obtuvieron en estudios anteriores (48; 54). Los ratones castrados tuvieron un tiempo de latencia de escape mayor con respecto a los demás grupos después de cinco días de entrenamiento debido a que no presentaban una producción normal de andrógenos, y es conocido que estas hormonas después de convertirse *in situ* a estradiol por la enzima aromatasa (63), se unen a receptores específicos en el hipocampo, que están

estrechamente ligados a las capacidades de memoria y aprendizaje (36; 84). Por lo tanto, los estrógenos afectan áreas del cerebro que no están involucradas principalmente en la reproducción (85).

El 80 % de estradiol circulante en machos no se origina de los testículos, si no de la aromatización de la testosterona que ocurre en la periferia o áreas cerebrales relacionadas a la memoria visual como la corteza frontal y el hipocampo (3; 53).

Se sabe que la terapia de reemplazo hormonal mejora el déficit de andrógenos en hombres en edad avanzada (4; 54; 47; 28), y que los estrógenos exógenos revierten el efecto de la andropausia, mejorando significativamente la Memoria Visual y revirtiendo los efectos neurotóxicos causado por la privación de andrógenos (4).

Los estrógenos exógenos son mediados por la expresión diferencial de α -receptores de estrógenos versus los β -receptores de estrógenos en estructuras cerebrales que activan o inhiben los mecanismos de muerte celular (48).

Además, en la literatura se ha demostrado que existen plantas con actividad estrogénica que además presentan compuestos fitoquímicos denominados fitoestrógenos, que mejoran la memoria y el aprendizaje (37).

Los fitoestrógenos son moléculas presentes en muchas plantas que son estructuralmente y funcionalmente similares al estradiol (con una estructura

difenólica no esteroidea) y tienen la capacidad de unirse selectivamente a los receptores de estrógenos (39).

Los fitoestrógenos que se han estudiado profundamente y que se encuentran en mayor cantidad son los de la soja (71). En la soja estos fitoestrógenos son isoflavones que presentan una gran afinidad para unirse mayormente a los receptores beta estrogénicos que a los receptores alfa, optimizando el aprendizaje espacial (62). Además se ha encontrado alta cantidad de isoflavones en regiones cerebrales (corteza frontal y cerebelo) que expresan este subtipo de receptores y que se encuentran muy relacionadas con proceso de aprendizaje y memoria. (44; 48). Por lo tanto, animales que ingieran dietas con alto contenido de fitoestrógenos están continuamente expuestos a compuestos activos que influyen su sistema endocrino. (8)

Lepidium meyenii presenta compuestos fitoquímicos como glucosinolatos y polifenoles (34; 45); así como también ácidos grasos saturados e insaturados, saponinas y fitoestrógenos (1). Estos últimos pueden revertir los efectos del envejecimiento y potenciar funciones cognitivas (37; 32; 26). Estos fitoestrógenos son esteroides como el betasitosterol, el campesterol, y el estigmasterol (81). Todos ellos llevan como base la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno, común a las hormonas esteroideas (25). Por lo tanto el consumo de Maca estaría relacionado con la ingesta de compuestos activos similares a los estrógenos.

Además, de acuerdo con la literatura, los fitoestrógenos juegan un rol importante sobre las hormonas sexuales, normalizando la secreción de las mismas (57).

Probablemente, los metabolitos de la Maca Negra estarían actuando a nivel de los receptores beta estrogénicos, como en otras plantas con actividad estrogénica (37). Algunos autores soportan esta idea debido al contenido de triterpenos esteroideos presentes en la Maca (40). Estos compuestos no ejercen una actividad androgénica directa ya que no pueden regular el elemento respuesta a glucocorticoides (GRE). (6). Sin embargo otros autores señalan que existen componentes de la Maca que tienen actividad fitoandrogénica y que se unen a receptores androgénicos (AR). (55).

La Maca Negra consumida oralmente estaría actuando también como fitoprotector neuronal en el desarrollo cognitivo, como lo observado con las dietas de Soja, Fresa y Espinaca (37; 35).

En este estudio no se midieron los niveles séricos de testosterona o estradiol; no se utilizaron controles tratados con testosterona o estradiol exógenos por el tiempo de tratamiento, tampoco se hicieron estudios histológico en las áreas cerebrales mencionadas para evaluar la expresión de receptores estrogénicos o cuantificar los fitoestrógenos presentes en estas áreas; pero se sabe que la Maca no afecta los niveles séricos de estradiol en ratas macho después de 42 días de tratamiento (24; 64); y que los resultados sugiere que ciertos metabolitos de Maca Negra podrían estar actuando como moduladores en los receptores estrogénicos en áreas cerebrales involucradas con la memoria Visual alterando la actividad neural, esencial para el aprendizaje y la memoria,

produciendo un efecto similar a la terapia de reemplazo hormonal (33). No obstante, se necesita realizar estudios detallados a nivel molecular para corroborar dicha afirmación.

No se descarta la posibilidad de que los esteroides gonadales u otras sustancias producidas por los testículos puedan tener alguna influencia adicional. Es necesario realizar investigaciones a nivel molecular en zonas cerebrales relacionadas con el aprendizaje y la memoria; además de una evaluación detallada utilizando diferentes tipos de extractos de Maca Negra para identificar los metabolitos específicos y los posibles mecanismos de acción que estarían involucrados en los procesos de memoria y el aprendizaje.

VII. CONCLUSIONES

1. El extracto atomizado de Maca Negra (dosis de 1g de MN /Kg de peso corporal) disminuye el peso corporal después de 50 días de tratamiento.
2. La Maca Negra mejora la Memoria Espacial disminuyendo el tiempo de Latencia de Escape en la Prueba de nado "Morris maze" revirtiendo el efecto de la castración en ratones deficientes de andrógenos.

VIII. RECOMENDACIONES

1.- Es necesario realizar investigaciones a nivel molecular en el modelo experimental, referente a receptores en el hipocampo, en la corteza frontal y en otras áreas involucradas con la memoria y aprendizaje.

2.- Debe realizarse una evaluación detallada utilizando diferentes tipos de extracciones de Maca Negra para identificar los metabolitos específicos y los posibles mecanismos de acción que estarían involucrados en estos procesos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. APUMAYTA U, LOCK O. La Maca, importante especie vegetal peruana merece un mayor estudio. *Revista de Química PUCP*. 1993; 7:214-16.
2. BARONDES SH, COHEN HD. Arousal and the conversion of “short-term” to “long-term” memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1968; 61(3):923-9.
3. BECKER, K. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. Lippincott, Philadelphia. 1995.
4. BEER TM, BLAND LB, BUSSIERE JR, NEISS MB, WERSINGER EM, GARZOTTO M, RYAN CW, JANOWSKY JS. Testosterone loss and estradiol administration modify memory in men *J. Urol* 2006; 175:130 - 5
5. BLACK AH, NADEL L, O’KEEFE J. Hippocampal function in avoidance learning and punishment. *Psychol Bull*. 1977. 84: 1107 – 29.
6. BOGANI P, SIMONINI F, IRITI M, ROSSONI M, FAORO F, POLETTI A, VISIOLI F. *Lepidium meyenii* (Maca) does not exert direct androgenic activities. *J Ethnopharmacol*. 2006; 104(3):415-7.
7. BRADLEY W., DAROFF R., FENICHEL G., JANCOVICK J. *Neurologia Clinica: Diagnóstico y tratamiento*. Madrid. 2006. EL SEVIER. Cuarta edición. Pp. 68-70
8. BROWN NM, SETCHELL KDR. Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones. *Lab Invest*. 2001;81:735–47
9. CICERO AFG, BANDIERE E, ARLETTI R. *Lepidium meyenii* Walp improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *J Ethnopharmacol*. 2001.75: 225–29.
10. CRONQUIST A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York. Columbia University Press. 1981.pp. 1262

11. CHACON RG. Estudio Fitoquímico de *Lepidium meyenii Walp.* Tesis de Bachiller de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú. 1961. pag. 46
12. CHEN CC, CHAUNG HC, CHUNG MY, HUANG LT. Menhaden fish oil improves spatial memory in rat pups following recurrent pentylenetetrazole-induced seizures. *Epilepsy Behav.* 2006. 8:516-21.
13. DINI A, MIGLIUOLO G, RATRELLI L, SATURNINO P, SCETTINO O. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chemistry*, 1994; 49:347-49
14. DINI I., TENORE GC, DINI A. Glucosinolatos from Maca (*Lepidium meyenii*). *Biochem System Ecol*, 2002; 30:1087-90.
15. DRISCOLL I, HAMILTON DA, PETROPOULOS H, YEO RA, BROOKS WM, BAUMGARTNER RN, SUTHERLAN RJ. The aging hippocampus: cognitive, biochemical and structural findings. *Cereb Cortex*, 2003; 13: 1344-51.
16. ETTEMBERG A, MOAL ML, KOOB G, BLOOM FE. Vasopressin potentiation in performance of a learned appetitive task: reversal by a pressor antagonist analog of vasopressin. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983; 18:645–647.
17. FASSINO S, TORRE E. Short-term memory. An experimental model. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1980; 56(6):601-5.
18. FRYE CA, STURGIS JD. Neurosteroids affect spatial/reference, working, and long-term memory of female rats. *Neurobiol Learn Mem.* 1995; 64:83-96.
19. GONZALES G, RUIZ A, GONZALES C, VILLEGAS L, CORDOVA A. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian J. Androl.* 2001a; 3: 231-3.
20. GONZALES GF, CORDOVA A, GONZALES C, CHUNG A, VEGA K, VILLENA A. *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian J. Androl.* 2001b; 3: 301-3.

21. GONZALES GF, RUBIO J, CHUNG A, GASCO M, VILLEGAS L. Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (Maca) on testicular function in male rats ANDROLOGY 2003; 5:349-52.
22. 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.
23. GONZALES GF, MIRANDA S, NIETO J, Y COL. Red Maca (*Lepidium meyenii*) Reduced prostate size in rats. 2005. Reproductive Biology and Endocrinology 20; 3-5.
24. 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. 2006a; 103:448–454.
25. GONZALES GF Maca de la Tradición a la Ciencia. Lima. CONCYTEC. 2006b
26. GONZALES, GF. Biological effects of *Lepidium meyenii*, Maca, a plant from the highlands of Peru. In: Singh VK, Bhardwaj R, Govil JN, Sharma RK. , editor. Natural Products: in Recent Progress in Medicinal Plants. USA. Studium Press LLC: 2006c p. 217.
27. GÖNENÇ S, UYSAL N, AÇIKGÖZ O, KAYATEKIN BM, SÖNMEZ A, KIRAY M, AKSU I, GÜLEÇER B, TOPÇU A, SEMİN I. Effects of melatonin on oxidative stress and spatial memory impairment induced by acute ethanol treatment in rats. Physiol Res. 2005; 54(3):341-8.
28. GULINELLO M, LEBESGUE D, JOVER-MENGUAL T, ZUKIN RS, ETGEN AM. Acute and chronic estradiol treatments reduce memory deficits induced by transient global ischemia in female rats. Hormones and behavior.2006; 49:246-60.
29. HALPERN DF: Sex Differences in Cognitive Abilities. 3rd Edition. San Bernardino: LEA press; 2000.
30. ICHIHARA K, NABESHIMA T, KAMEYAMA T. Differential effects of pimozile and SCH23390 on acquisition of learning in mice. Eu J Pharmacol. 1989; 164:189–95.

31. ICHIHARA K, NABESHIMA T, KAMEYAMA T. Dopaminergic agonists impair latent learning in mice: possible modulation by noradrenergic function. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 264:122–28.
32. JANOWSKY JS. The role of androgens in cognition and brain aging in men. *Neuroscience.* 2006; 138:1015-20
33. JOHNSON RT, BURK JA. Effects of gonadectomy and androgen supplementation on attention in male rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2006; 85:219-27.
34. JONES BA, WATSON NV. Spatial memory performance in androgen insensitive male rats *Physiology & behavior.* 2005; 85:135-41.
35. JOSEPH JA, SHUKITT-HALE B, DENISOVA NA, PRIOR RL, CAO G, MARTIN A, TAGLIALATELA G, BICKFORD PC. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin E supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci.* 1998; 18:8047–55.
36. JURASKA JM Sex differences in "cognitive" regions of the rat brain. *Psychoneuroendocrinology.* 1991. 16:105-9.
37. KISHORE K, SINGH M. Effect of bacosides, alcoholic extract of *Bacopa monniera* Linn. (brahmi), on experimental amnesia in mice. *Indian J Exp Biol.* 2005, 43(7):640-5.
38. KRITZER, M.F., ADLER, A., MAROTTA, J., SMIRLIS, T., Regionally selective effects of gonadectomy on cortical catecholamine innervation in adult male rats are most disruptive to afferents in prefrontal cortex. *Cereb. Cortex.* 1999. 9, 507-18.
39. KUIPER GG, LEMMEN JG, CARLSSON B, CORTON JC, SAFE SH, VAN DER SAAG PT, VAN DER BURG B, GUSTAFSSON JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology.* 1998; 139:4252–63.
40. LAMA G, QUISPE G, RAMOS D, FERREYRA C, CASAS H, APUMAYTA V, 1994. Estudio de la propiedad estrogénica de *Lepidium meyenii* en ratas. En: Resúmenes

de los trabajos, II congreso Nacional de Ciências Farmacéuticas y bioquímica “Marco Antonio Garrido Malo”, 17-21, Octubre de 1994. Lima - Perú. Pag 73.

41. LERANTH, C., PETNEHAZY, O., MACLUSKY, N.J., Gonadal hormones affect spine synaptic density in the CA1 hippocampal subfield of male rats. *J. Neurosci.* 2003. 23, 1588–92.
42. LEE KJ, DABROWSKI K, SANDOVAL M, MILLER MJS. Activity-guided fractionation of phytochemicals of Maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture* 2005; 244: 293-301.
43. LEE YOON-BOK, LEE HYONG JOO AND SOHN HEON SOO Soy isoflavones and connective function. *J Nutr Biochem.* 2005; 16:641-9.
44. LEPHART ED, SETCHELL KD, HANDA RJ, LUND TD. Behavioral effects of endocrine-disrupting substances: phytoestrogens. *ILAR J.* 2004; 45(4):443-54.
45. LI G, AMMERMAN U, QUIROS CF. Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacon) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products. *Econ Bot*, 2001; 55:225– 62.
46. LORING-MEIER S, HALPERN DF. Sex differences in visuospatial working memory: components of cognitive processing. *Psychon Bull Rev.* 1999;6:464-71
47. LUINE VN, RICHARDS ST, WU VY, BECK KD. Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav.* 1998; 34:149-62.
48. LUND TRENT D, WEST TIMOTHY W, TIAN LILYAN Y, BU LIHONG H, SIMMONS DANIEL L, SETCHELL KENNETH DR, HERMAN ADLERCREUTZ, LEPHART EDWIN D. Visual spatial memory is enhanced in female rats (but inhibited in males) by dietary soy phytoestrogens *Neuroscience.* 2001; 2: 20.
49. MAMIYA T, NODA Y, NISHI M, TAKESHIMA H, NABESHIMA T. Enhancement of spatial attention in nociceptin/orphanin FQ receptor-knockout mice. *Brain Res.* 1998; 783:236–40.

50. MORGADO BERNAL I. Psicobiología del aprendizaje y la memoria. Cuadernos de información y comunicación. 2005. Pag 10
51. MORRIS R. Developments of water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods*, 1984; 11: 47-60.
52. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide of the care and use of laboratory animals. Washington DC; National Academy Press, 1996. p. 125.
53. NAFTOLIN, F., Brain aromatization of androgens. *J Reprod Med*. 1994. 39,257–61.
54. NODA A, NODA Y, KAMEI H, ICHIHARA K, MAMIYA T, NAGAI T, SUGIERA S, FURUKAWA H, NABESHIMA T. Phencyclidine Impairs Latent Learning in Mice: Interaction between Glutamatergic Systems and Sigma Receptors. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24:451-60.
55. ONG V, TAN B. Novel phytoandrogens and lipidic augmenters from *Eucommia ulmoides*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2007. 29: 7-3.
56. ORTEGA RM, RESQUEJO AM, ANDRES P, LOPEZ-SOBALER AM, QUINTAS ME, REDONDO MR, NAVIA B, RIVAS T. Dietary intake and cognitive function in a group of elderly people. *Am J Clin Nutr*, 1997; 66: 803-9.
57. OSHIMA M, GU Y, TSUKADA S. Effect of *Lepidium meyenii* Walp and *Jatropha macrantha* on blood levels of Estradiol-17 β , Progesterone, Testosterone and the Rate of Embryo Implantation in mice. *Theriogenology*. 2003; 65 (10):1145-46.
58. PIACENTE S, CARBONE V, PLAZA A, ZAMPELLI A, PIZZA C. Investigation of the tuber constituents of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) 2002. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 5621 – 25
59. QUIROZ C, ALIAGA R. Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, Maca y Yacon. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. (M. Hermann and J. Heller, eds). Rome. Institute of Plant Genetic and crop Plant Research, Gatersleben / International Plant Genetic Resources Institute, 1997.

60. REA J, Raíces andinas: Maca. In Cultivos marginados, otra perspectiva de 1942 (J.E. Hernández Bermejo y J.E. León, eds.) Roma, FAO, 1992.
61. RIGTER H, JENSEN RA, MARTINEZ JL JR, MESSING RB, VASQUEZ BJ, LIANG KC, MCGAUGH JL. Enkephalin and fear-motivated behavior. 1980. Proc Natl Acad Sci USA.77: 3729-32.
62. RISSMAN EF, HECK AL, LEONARD JE, SHUPNIK MA, GUSTAFSSON JA. Disruption of estrogen receptor beta gene impairs spatial learning in female mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2002. 99(6):3996-4001
63. ROOF RL. Neonatal exogenous testosterone modifies sex difference in radial arm and Morris water maze performance in prepubescent and adult rats. Behav Brain Res. 1993. 53: 1-10.
64. 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. 2006a; 44: 1114-22.
65. RUBIO J, CALDAS M, DÁVILA S, GASCO M, GONZALES GF. Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (Maca) on learning and depression in ovariectomized mice. BMC Complement Altern Med. 2006b; 23; 6: 23.
66. RUBIO J, DANG H, GONG M, LIU X, CHEN SL, GONZALES GF. Aqueous and hydroalcoholic extracts of Black Maca improve scopolamine-induced memory impairment in mice. Food Chem Toxicol. 2007; 45: 1882-90.
67. RUBIO J, QIONG W, LIU X, JIANG Z, DANG H, CHEN SL, GONZALES GF. Aqueous Extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on Memory Impairment Induced by Ovariectomy in Mice. Evid Based Complement Alternat Med. 2008 Oct 9. [Epub ahead of print].
68. SANDOVAL M, OKUHAMA NN, ANGELES FM. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidium meyenii*). 2002. Food Chemistry 79: 207-13

69. SANDSTROM NJ, KIM JH, WASSERMAN MA. Testosterone modulates performance on a spatial working memory task in male rats. *Hormones and Behavior*. 2006. 50: 18-26.
70. SANSA J., PRADOS J. Ensombrecimiento entre puntos de referencia en una tarea de navegación. *Psicológica*. 2003; 24: 17-29
71. SETCHELL KDR. Phytoestrogens: biochemistry, physiology and implications for human heart of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr*. 1998;129:1333–46.
72. SINGH M, MEYER EM, MILLARD WJ, SIMPKINS JW. Ovarian steroid deprivation results in a reversible learning impairment and compromised cholinergic function in female Sprague-Dawley rats. *Brain Res*, 1994; 644: 305–12.
73. TELLO J, HERMANN M, CALDERON A, La Maca (*Lepidium meyenii Walp*) cultivo alimenticio potencial para las zonas altoandinas. *Boletín de Lima*. 1992.14: 59-66.
74. TOLMAN, E. C.; HONZIK, C. H. "Insight" in rats. University of California Publications in Psychology. 1930, 4: 215-32.
75. TORTORA GERARD J. & REYNOLDS GRABOWSKI S. Principios de Anatomía y Fisiología. 7° edición. Madrid. Mosby/Doyma. 1996.
76. TRESGUERRES JAF. Fisiología Humana. 2° edición. Madrid. McGraw Hill. 2000.
77. VALERIO LG, GONZALES GF. Toxicological aspects of the South American herbs Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*). *Toxicol Rev*. 2005; 24:11–35.
78. WARREN SG, JURASKA JM: Spatial and nonspatial learning across the rat estrous cycle. *Behav Neurosc*. 1997; 111:259-66.
79. YLLESCAS M. Estudio Químico y Físicoquímico de tres ecotipos de *Lepidium meyenii* de Carhuamayo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 1994.
80. ZHANG Y, YU L, AO M, JIN W. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii Walp*. on osteoporosis in ovariectomized rat. *J Ethnopharmacol*, 2006.105:274-79.

81. ZHENG BL, HE K, KIM CH, ROGERS L, SHAO Y, HUANG ZY, LU Y, YAN SJ, QIEN LC, ZHENG QY. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*. 2000; 55:598–60.
82. KANDEL R.E. Biology and the Future of Psychoanalysis: A New Intellectual Framework for Psychiatry Revisited. *The American Journal of Psychiatry*. 1999. 156: 505-24.
83. JERI H. Estudio fitoquímico de la maca. Pasco (Perú): Facultad de Ingeniera. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, 1990
84. STOMATI M, RUBINO S, SPINETTI A, Y COL. Endocrine, neuroendocrine and behavioural effects of oral dehydroepiandrosterone sulphate supplementation in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*. 1999; 14:15-25
85. MCEWEN BS, ALVES E. Estrogen Actions in the Central Nervous System. *Endocrine Reviews* 1999. 20: 279-307

RESUMEN DE ABBREVIATURAS

MN	: Mica Negra
MEV	: Microscopía Electrónica de Voltaje
CTX	: Calcio
SHAM	: Ratas controladas
OVX	: Ratas ovariectomizadas

ANEXOS

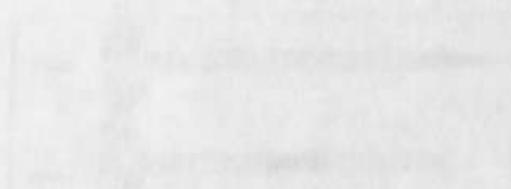
DETALLES

- Detalles de los métodos de preparación de las muestras para el análisis por EDX.
- Detalles de los procedimientos de análisis de datos.

ILUSTRACIONES

- Ilustración 1: Diagrama de flujo de la metodología de investigación.
- Ilustración 2: Diagrama de flujo de la metodología de investigación.
- Ilustración 3: Diagrama de flujo de la metodología de investigación.
- Ilustración 4: Diagrama de flujo de la metodología de investigación.

IDENTIFICACION DE LA FOLIA



RESUMEN DE ABREVIATURAS

MN	: Maca Negra.
MEV	: Memoria Espacial Visual.
CTX	: Castrados.
SHAM	: Ratones pseudo perados.
OVX	: Ratonas ovariectomizadas

ENLACES:

- http://bvs.minsa.gob.pe/php/decsws.php?tree_id=D08.811.682.664.750&lang=es
www.pubmed.com
- <http://conganat.uninet.edu/6CVHAP/autores/trabajos/T332/index.html>

ILUSTRACIONES

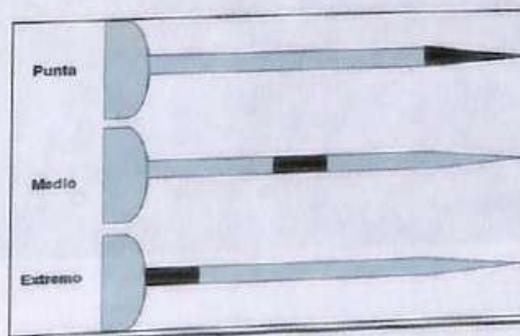
Ilustración 1: Diana Alcántara Zapata

Ilustración 2: Diana Alcántara Zapata

Ilustración 3: <http://www.currentprotocols.com/protocol/ph0514>

Ilustración 4: <http://sfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/nutrbioc/e/study/morris.jpg>

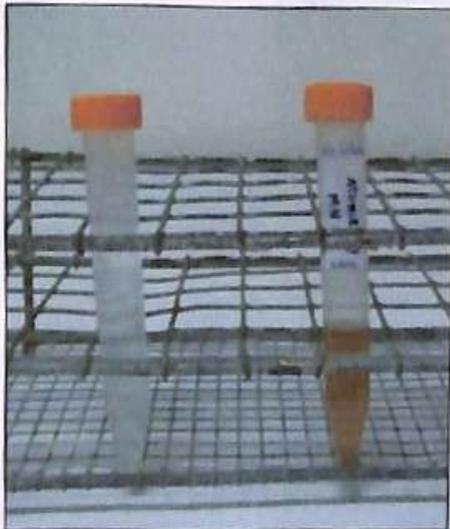
IDENTIFICACION DE LA COLA



FOTOGRAFIAS



Lepidium meyenii
Cultivar Negro



Tratamiento:
Agua Destilada y
Extracto atomizado de
Maca Negra

Bioterio del Laboratorio de Endocrinología y Reproducción



Memoria Espacial Visual: Morris Maze



Realizando tarea de navegación



Llegando a la plataforma

CRONOGRAMA

