

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA



**EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE TRES DIFERENTES
ECOTIPOS DE *Lepidium meyenii* (maca) EN EL TRACTO
REPRODUCTIVO MASCULINO DE RATAS MACHO DE LA CEPA
HOLTZMAN**

UPCH-BIBLIOTECA

Tesis Para Optar el Título de Licenciado en Biología

Carla Gonzales Arimborgo

LIMA-PERU
2004

ASESOR DE LA TESIS

DR. GUSTAVO F. GONZALES

Director del Instituto de Investigaciones de la Altura

JURADO

PRESIDENTE:

DR. JOSE BAUER

VOCAL:

M.SC. LUIS ROSSI

SECRETARIA:

ING. GILMA FERNANDEZ

Este trabajo de Investigación se lo dedico a:

A mi abuelo en el cielo quien ahora debe estar sonriendo, diciendo: misión cumplida.

Al motor que impulsa mi vida, mi Matías:

“Hijo mío, la más amada de mis obras, la más valiosa, la única que podría hacerme perdurar a través del tiempo, y hacer que sienta no haber pasado la vida sin dejar huella.

Tú, hijo mío, serás mi continuación, serás la realización de mis más caros anhelos y tus triunfos serán mis goces presentidos y serán mi orgullo actual, que se despierta, cuando miro tus ojos encendidos de extraña e incomprensible luz, producto inmaterial de fantásticas visiones que anidan en tu frente en desarrollo...”

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Gustavo F. Gonzales, mi padre y mi maestro, que me dio lo mejor de él para sacar lo mejor de mí.

A mis madres que se desvelaron tantas noches conmigo, por su incondicional apoyo y sobretodo siempre creer en mí.

Al Instituto de Investigaciones de la Altura donde inicie mis prácticas en investigación y aprendí todo lo que necesite para desarrollar éste estudio. Al Laboratorio de Reproducción de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, lugar donde se llevo a cabo el estudio, Sharon, Arturo y Julio, por su invaluable ayuda.

Al Fondo Concursable al Apoyo de la Investigación en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Al Dr. Fernando Larrea y PLACIRH quienes me dieron su confianza y apoyo para realizar esta investigación.

INDICE

RESUMEN	Pág. 7
SUMMARY	Pág. 8
I. INTRODUCCION	Pág. 9
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	Pág. 13
III. HIPOTESIS	Pág. 14
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACION	Pág. 14
V. OBJETIVOS	Pág. 14
VI. MATERIALES Y METODOS	Pág. 15
VI.1. Materiales biológicos	Pág. 15
VI.2. Materiales de laboratorio	Pág. 15
VI.1. Diseño del Estudio	Pág. 15
VI.2. Animales	Pág. 16
VI.3. Tratamiento	Pág. 17
VI.4. Transiluminación	Pág. 18
VI.5. Pesos Testicular, de Epidídimos y de Vesículas Seminales	Pág. 18
VI.6. Conteo de Espermatozoides en Epidídimo	Pág. 19
VI.7. Movilidad de los Espermatozoides	Pág. 19
VI.8. Análisis de Resultados	Pág. 19
VII. RESULTADOS	Pág. 21
VII.1. Pesos de Testículos, de Epidídimos y de Vesículas Seminales	Pág. 21
VII.2. Estadios del Epitelio Seminífero	Pág. 26
VII.3. Movilidad Espermática en Epidídimo	Pág. 28
VII.4. Conteo de Espermatozoides en Epidídimo	Pág. 29
VIII. DISCUSION	Pág. 31
VIII.1. Efecto de la Maca Sobre la Espermatogénesis	Pág. 31
VIII.2. Efecto de los Ecotipos Sobre Parámetros Reproductivos	Pág. 32
IX. CONCLUSIONES	Pág. 36
X. REFERENCIAS	Pág. 37
ANEXO 1	Pág. 41
ANEXO 2	Pág. 42
ANEXO 3	Pág. 43
ANEXO 4	Pág. 44
ANEXO 5	Pág. 45
ANEXO 6	Pág. 46

RESUMEN

La maca es una planta de la familia Brassicaceae que se cultiva en la sierra peruana a altitudes entre los 3350 y 4450 m.s.n.m. Esta planta ha sido utilizada tradicionalmente en los Andes centrales, atribuyéndosele propiedades favorables sobre la fertilidad tanto en animales como en humanos. Diversos estudios en animales demuestran que la maca amarilla favorece la espermatogénesis, y aumenta la concentración de espermatozoides en el epidídimo. Los tratamientos sin embargo no han llegado a completar el periodo de duración de la espermatogénesis que en la rata es de 42 días. Igualmente los estudios fitológicos han determinado la existencia de diferentes ecotipos de la maca que se pueden reconocer por el color de la raíz.

El objetivo de este trabajo es determinar si la maca tiene efecto sobre todo un periodo de espermatogénesis en la rata y si existen diferencias en los parámetros reproductivos por acción de tres ecotipos de maca (roja, amarilla y negra).

Los tres diferentes ecotipos de maca (rojo, amarillo y negro) han sido obtenidos de la provincia de Carhuamayo-Junín. Las variables a estudiar fueron los pesos de testículos, epidídimos y vesículas seminales; los estadios de la espermatogénesis por transiluminación, la motilidad y concentración de espermatozoides en el epidídimo, en dos diferentes tiempos de tratamiento 7 y 42 días.

Los resultados obtenidos demuestran que definitivamente la maca tiene un efecto en la espermatogénesis durante todo el proceso del mismo aumentando la concentración de espermatozoides luego de 42 días de tratamiento. El efecto sobre el conteo de espermatozoides se ve tan temprano como a los 7 días de tratamiento. En relación a los ecotipos se demuestra que la maca negra tiene el mejor efecto sobre los parámetros reproductivos mejorando el peso testicular, y de epidídimo, aumentando el conteo de espermatozoides en epidídimo y mejorando la movilidad de los espermatozoides. La maca amarilla tiene efecto sobre el conteo de espermatozoides en menor magnitud que la negra pero no sobre la movilidad de espermatozoides. La maca roja no promueve la espermatogénesis ni la movilidad de espermatozoides; se observa sin embargo una disminución al tercio del peso de las vesículas seminales (órgano andrógeno dependiente), lo que podría indicar un importante efecto supresor sobre la actividad de las glándulas sexuales accesorias y podría ser un producto importante de estudio en patología prostática, estructura también andrógeno dependiente.

Los datos obtenidos nos permiten concluir que efectivamente los efectos de la maca varían según el ecotipo, siendo la maca negra la que tiene un mayor efecto positivo sobre la fertilidad en ratas macho, y abre la posibilidad para el estudio de la maca roja como un inhibidor celular y su potencial efecto anti-tumoral.

SUMMARY

Maca (*Lepidium meyenii*) is a Peruvian Hypocotyl to the Brassicaceae family and grown exclusively between 3350 and 4450 m altitude in the central Peruvian Andes. According to the folk belief, maca is a plant that enhances fertility in human and domestic animals. Several studies in animal demonstrated that yellow maca improves spermatogenesis and it increases epididymal sperm count. However, treatments do not complete the total length of a spermatogenic process that it lasts 42 days in the rat. Similarly, phytological studies had determined the existence of different ecotypes of maca recognized by the color of the roots.

The objective of the present study was to determine if maca have effect after a treatment lasting the total length of a spermatogenic process in the rat and if there are differences in the reproductive parameters when three ecotypes of maca (red, yellow and black) are assessed.

Three different ecotypes of maca (red, yellow and black) were obtained in the province of Carhuamayo, Junin. The following variables were studied: testis, epididymis and seminal vesicles weight; stages of the spermatogenic cycle by transillumination, sperm motility and epididymal sperm count at 7 and 42 days of treatment.

Results obtained showed definitively that maca has an effect in spermatogenesis during the whole process increasing the sperm concentration at the end of 42 days of treatment. The effect on sperm count was observed since 7 days of treatment. In relation to ecotypes has been demonstrated that black maca has the better effect on reproductive parameters enhancing testicular and epididymal weight; increasing epididymal sperm count and epididymal sperm motility. Yellow maca has effect on sperm count but in less magnitude than black maca, but it has not effect on sperm motility. Red maca does not improve spermatogenesis nor sperm motility; however it is observed a reduction in the seminal vesicles weight to a one third the value of the control group. Seminal vesicles is a androgen-dependent gland, this suggest an important suppressor effect of red maca on sex accessory glands and it could be an important product to study prostatic pathology, an structure also androgen-dependent.

Data obtained allow us to conclude that effectively effects of maca vary according to the ecotype. Black maca has the better effect on fertility in male rats, and open the possibility to the study of red maca as an cell inhibitor and its potential anti-tumour effect.

I. INTRODUCCION

La especie *Lepidium meyenii*, conocida también como "maca", "Maka" o "maca-maca" es una crucífera que crece en los paramos andinos, de 3 700 m a 4 500 m.s.n.m. y cuya cuna y centro de mayor producción se encuentra en la Meseta de Chinchaycocha actualmente Carhuamayo, departamento de Junín, y en algunos estratos de Pasco.

La especie taxonómica *Lepidium meyenii* es descrita científicamente por primera vez en 1843, a partir de un espécimen colectado en el Departamento de Puno. Y en 1961 se realiza el primer estudio fitoquímico y biológico de la maca presentada por Gloria Chacón como tesis de Biología (1).

Según la clasificación taxonómica de A. Cronquist (1981):

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida (Dicotiledoneas)

SUBCLASE IV: Dilleniidae

ORDEN: Capparales

FAMILIA: Brassicaceae

GENERO: *Lepidium*

ESPECIE: *Lepidium meyenii* Walpers

N.V.: maca, maka, maino, ayak chichita, ayak willku; ginseng peruano.

Se han hecho populares en los últimos años diversos preparados que contienen determinadas concentraciones de raíz de maca en jugos, licores y otros productos que también se expanden en Lima y otras ciudades. La presentación que ha invadido el mercado nacional e internacional son las cápsulas y tabletas; preservándose, sin embargo, el uso tradicional de la maca.

Si bien cronistas e historiadores ya habían advertido los usos de la maca como nutriente y promotor de la fertilidad, recientes análisis de laboratorio expondrían otras poderosas razones para consumirla. Desde el punto de vista proteico, la maca es comparable a la quinua y a la kiwicha y superior a algunos cereales, la maca posee extraordinarias concentraciones de calcio, fósforo y zinc, benéficas para la salud (2).

La principal cualidad atribuida a esta planta, ya desde la época prehispánica, es la de mejorar la fertilidad; motivo por el cual se hallaba en la categoría de mágica dentro de los ritos Incas. Textos publicados en documentos históricos como las crónicas de la conquista de los Incas, así como los más recientes en artículos de periódicos y revistas, afirman que la maca favorecía el aumento de la población en los Andes centrales, y regeneraba la fertilidad en el ganado vacuno (3).

En la actualidad se han desarrollado investigaciones para demostrar el efecto de la maca en ratas machos sobre la conducta sexual (4) y la fertilidad (5) teniendo como resultado que, efectivamente, la maca influye favoreciendo la fertilidad masculina, incrementando la frecuencia de los estadios VIII al XII de la espermatogénesis en ratas (5). Estos estudios se han realizado en periodos de administración de 7 a 21 días con lo cual es difícil concluir que la maca mejora la espermatogénesis puesto que la duración de todo el proceso dura 42 días.

También se han realizado investigaciones sobre el efecto de tabletas de la maca gelatinizada en hombres aparentemente sanos, dando como resultado un aumento en la concentración y motilidad de los espermatozoides (6). Este producto se vende en las farmacias como nutracéutico.

Todos los estudios sobre el efecto de la maca se han realizado en la variedad amarilla, y es la misma que solicitan las empresas farmacéuticas para preparar sus productos. Sin embargo, en la literatura se describen diferentes ecotipos o variedades de maca, en base al color externo de la raíz, las que presenta principalmente colores amarillo, rojo, y negro (Anexo. 1); existiendo éstas subcategorías en los departamentos de Junín y Cerro de Pasco (7, 8); comprobándose en cada uno de ellos diferencias en cuanto a proteínas, calorías, calcio, fósforo, hierro, carbohidratos, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico y caroteno (9).

Tabla 1. Componentes nutricionales de los ecotipos de maca

Componentes mas abundantes	Amarillo (g%)	Rojo (g%)	Negro (g%)
Humedad	9,71	10,14	10,47
Grasas	17,99	17,22	16,31
Fibras	5,3	5,45	4,95
Carbohidratos	62,96	62,6	63,82
Proteinas puras	37,86	37,52	38,18
Vitaminas	Amarillo (mg%)	Rojo (mg%)	Negro (mg%)
Niacina	43,3	37,27	39,06
Ac. Ascórbico	3,52	3,01	2,05
Riboflavina	0,61	0,5	0,76
Tiamina	0,42	0,52	0,43
Minerales	Amarillo (mg%)	Rojo (mg%)	Negro (mg%)
Potasio	1130	1160	1000
Sodio	20	20	40
Magnesio	70	80	80
Calcio	190	200	240
Fósforo	320	290	280
Trazas	Amarillo (ppm)	Rojo (ppm)	Negro (ppm)
Cobre	6	6	8
Zinc	32	30	30
Manganeso	22	20	22
Fierro	80	62	86
Boro	12	24	26

Fuente: ver 43

Como se ha mencionado previamente, en los estudios realizados sobre los efectos biológicos, no se ha tomado en cuenta los diferentes ecotipos de maca. Esta variable, podría afectar el efecto deseado sobre la espermatogénesis; siendo, determinado ecotipo de maca el que presente una mayor eficacia. Esto tiene importancia pues se puede favorecer determinado tipo de producción de maca para determinado efecto, con lo que se daría un valor agregado a la actividad agrícola de los pobladores en los Andes.

Es por esto que se ha planteado la siguiente investigación con la finalidad de dilucidar el efecto de tres ecotipos sobre la espermatogénesis.

Este es un estudio analítico experimental, el cual ha sido diseñado para evaluar la variación de la espermatogénesis y de los órganos del aparato reproductivo masculino. La evaluación de la espermatogénesis se realiza usando las mediciones de los estadios de la espermatogénesis mediante la técnica de transiluminación, una técnica desarrollada en el Laboratorio de Reproducción del Instituto de Investigaciones de la Altura, utilizando como base la demostración, de que los túbulos seminíferos pueden observarse y diferenciar sus estadios por transiluminación (ANEXO 2) (10-12).

La transiluminación es una técnica que permite visualizar los diferentes estadios de la espermatogénesis (10). Esta técnica permite la colección de segmentos de túbulos seminíferos en estadios definidos del ciclo en condiciones *in vivo* y sin tinción, permitiendo el uso de diferentes tratamientos que pudieran modificar el patrón de los estadios (11). Es por ello que la técnica puede ser utilizada como modelo para evaluar el efecto de los diferentes ecotipos de maca sobre la espermatogénesis.

Esta investigación tiene una gran importancia, no solo desde el punto de vista biomédico, demostrando que esta planta nutricional y medicinal puede participar en el proceso del tratamiento de la infertilidad masculina; sino también económico, ya que con el conocimiento del ecotipo de maca con mayor eficacia sobre la espermatogénesis, se podría estandarizar el producto, dándole un valor agregado a este recurso natural, lo cual favorecería su comercialización.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La maca, *Lepidium meyenii*, es una crucífera de la familia Brassicaceae, que crece en los andes del Perú, a partir de los 4000 m.s.n.m. Esta planta ha sido utilizada desde hace, por lo menos, 2000 años por los nativos peruanos, debido a su fama de mejorar la capacidad reproductiva tanto de humanos como de animales.

Debido a ésta información y a los reportes de su uso popular, en la actualidad se han desarrollado investigaciones para demostrar su efecto sobre la fertilidad en ratas macho, así como en humanos; teniendo como resultado que, efectivamente la maca influye positivamente sobre la fertilidad masculina (5,6,18); sin embargo los estudios en ratas sólo abarcan un periodo de tratamiento de hasta 21 días por lo que se hace difícil concluir que efectivamente la maca influye sobre la producción de espermatozoides. Dado que la espermatogénesis en la rata dura 42 días (19-21), el presente estudio intentará demostrar que la maca administrada oralmente durante un periodo de 42 días, que cubre todo el proceso espermatogénico, resulta en una mayor producción de espermatozoides.

Igualmente existen diferentes ecotipos de maca, los cuales varían entre sí, no solo en el color externo de la raíz, sino también en su composición fitoquímica (43), por lo que es posible que también haya diferencias en sus efectos biológicos. A la fecha no existe ningún estudio que haya tratado de demostrar diferencias en los efectos biológicos de los diferentes ecotipos de maca.

Este estudio por lo tanto es de suma importancia para dilucidar el rol real de la maca sobre la espermatogénesis y el efecto diferencial o no de tres de los ecotipos más comunes.

III. HIPOTESIS

El efecto de la maca sobre la espermatogénesis, conteo de espermatozoides y motilidad de espermatozoides en epidídimo en ratas macho de la cepa Holtzman, varía según el ecotipo utilizado: amarilla, roja y negra.

IV. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Influencia la maca sobre la producción de espermatozoides luego de un tratamiento permanente durante todo el proceso espermatogénico (42 días)?
2. ¿El efecto de la maca sobre la espermatogénesis en ratas macho de la cepa Holtzman varía según el ecotipo?
3. ¿El efecto de la maca sobre la movilidad y la concentración de espermatozoides en ratas machos de la cepa Holtzman varía según el ecotipo?
4. ¿Existen diferencias en los pesos de órganos reproductivos con los tres diferentes ecotipos de maca?

V. OBJETIVOS

1. Determinar si la maca produce aumento en la producción de espermatozoides luego de un tratamiento de 42 días.
2. Determinar si existe diferencia sobre la espermatogénesis entre los tratamientos con tres diferentes ecotipos de maca; amarilla, roja y negra.
3. Identificar el ecotipo de maca a partir el cual se da un mayor efecto favorable sobre la espermatogénesis.
4. Determinar el peso de testículo, epidídimo (ANEXO 3) y vesículas seminales (ANEXO 4) en ratas tratadas con 3 ecotipos de maca.
5. Determinar la movilidad de espermatozoides en ratas tratadas con 3 ecotipos de maca.
6. Determinar el conteo de espermatozoides en epidídimo en ratas tratadas con 3 ecotipos de maca.

VI. MATERIAL Y METODOS

VI. 1. MATERIAL BIOLÓGICO

- 48 ratas macho de la cepa Holtzman
- 1.5 K maca ecotipo rojo
- 1.5 K maca ecotipo amarillo
- 1.5 K maca ecotipo negro
- 6 L de agua destilada
- 15 L de solución salina

VI. 2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Matraz de 4 L
- Gasa
- Beaker 2 L
- Placas Petri
- Laminas porta objetos
- Laminas cubre objetos
- Microscopio óptico
- Microscopio invertido

VI. 3. DISEÑO DEL ESTUDIO

Este es un estudio analítico experimental, el cual ha sido diseñado para evaluar la variación de la espermatogénesis usando las mediciones de los estadios de la espermatogénesis mediante la técnica de transiluminación.

El estudio ha sido realizado en ratas macho adultas de la cepa Holtzman, a las cuales, al término del tratamiento se les extrajo el testículo para realizar por transiluminación (10) las mediciones de los estadios del epitelio seminífero de los túbulos seminíferos; así como los epidídimos y vesícula seminal para ser analizados.

Las ratas se separaron en cuatro grupos, tres tratados con los diferentes ecotipos de maca (amarilla, roja y negra) en extracto acuoso; y un grupo tratado con agua al cual se denominó como grupo control.

La variable independiente es el diferente ecotipo de maca. La variable dependiente es la variación de los estadios del epitelio seminífero; los pesos testiculares, de epidídimos y vesículas seminales; y el conteo de espermatozoides en epidídimo.

VI. 4. ANIMALES:

Se utilizaron 48 ratas machos de la cepa Holtzman de aproximadamente 2 meses de edad, obtenidas del bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las ratas fueron distribuidas en 4 grupos (3 para los diferentes ecotipos de maca y uno para el control); cada grupo se dividió en 2 subgrupos de 6 ratas cada uno (diferente tiempo de tratamiento).

Grupo 1:

maca roja: 2ml diarios por vía oral durante 7 y 42 días
Sacrificio: 8 y 43vo día

Grupo 2:

maca amarilla: 2ml diarios por vía oral durante 7 y 42 días
Sacrificio: 8 y 43vo día

Grupo 3:

maca negra: 2ml diarios por vía oral durante 7 y 42 días
Sacrificio: 8 y 43vo día

Grupo 4:

Control: 2ml de suero fisiológico diario por vía oral durante 7 y 42 días
Sacrificio: 8 y 43vo día

VI. 5. TRATAMIENTO

Preparación del extracto acuoso

Los tres diferentes ecotipos de maca: amarilla, roja y negra se recolectaron en Carhuamayo, Junín y Simón Bolívar de Rancas, Pasco (a más de 4 000 m.s.n.m).

Para la preparación del extracto acuoso se hierven 500 gr de la raíz seca de cada ecotipo de maca en 1500 ml de agua destilada a 100°C por 90 minutos; se espera que la solución se enfríe a temperatura ambiente y luego se procede a filtrar la solución, obteniendo una dosis de 333 mg de la raíz de maca/ml. Esta dosis ha sido utilizada en los estudios previos demostrando un efecto fisiológico sobre los parámetros reproductivos en ratas macho (5).

Administración de maca

La administración de maca a los 4 grupos se realizó por vía oral mediante el uso de una sonda gástrica. Se administró 2 ml de extracto acuoso 1 vez al día por un periodo de 7 ó 42 días conforme se ha realizado en estudios anteriores en nuestro laboratorio (5,18). Este procedimiento se realizó a la misma hora todos los días. Para el caso del grupo control, las ratas recibieron el mismo esquema y procedimiento de inoculación pero con agua destilada. Al final de cada tratamiento, las ratas se sacrificaron por decapitación y se extrajeron los órganos reproductivos para el respectivo análisis.

VI. 6. TRANSILUMINACION:

El proceso de espermatogénesis se lleva a cabo en el epitelio seminífero de los túbulos. La técnica de transiluminación consiste en la observación de longitudes grandes de túbulos seminíferos, mediante la cual se pueden analizar los diferentes estadios del epitelio seminífero, que en la rata consiste de 14 estadios (10-12) (ANEXO 5). Esta técnica ha sido desarrollada y validada en el laboratorio (10) utilizando el método de transiluminación de Parvinen (11) (ANEXO 6).

En breve, se liberan los túbulos del testículo después de extraer la cápsula del testículo y se los coloca en solución fisiológica (0.9%). Se trabajó siempre con el testículo derecho. Luego se colocaron segmentos de túbulos en una placa Petri y se observaron en un microscopio de transiluminación. Se tomó nota de la longitud y el número de cada estadio que se encuentre a lo largo de 100 cm de túbulos seminíferos. Los datos obtenidos de las longitudes de cada estadio se expresaron en porcentaje.

VI. 7. PESOS TESTICULAR, DE EPIDIDIMOS Y DE VESICULAS SEMINALES:

Pesos testiculares

Se extraen los testículos del escroto (ANEXO 2) y se separan de sus respectivos epidídimos, limpiándolos de todo tejido o grasa que los rodee. Se procede a pesarlos en una balanza analítica individualmente.

Epidídimos

Se realiza una limpieza de los epidídimos de manera que quede libre de grasa y tejido adicional (ANEXO 3). Luego se procede a pesarlos individualmente en una balanza analítica.

Vesículas seminales

Se realiza una limpieza de la vesícula seminal de manera que quede libre de grasa y tejido adicional (ANEXO4). Luego se procede a pesarla en una balanza analítica.

VI. 8. CONTEO DE ESPERMATOZOIDES EN EPIDIDIMO

Se trabajó siempre con el epidídimo derecho, el cual se coloca en un homogenizador de vidrio con émbolo de teflón en 2 ml de NaCl al 0.9%. Se homogeniza la muestra por 5 minutos, se vacía el líquido en un tubo de ensayo de 12 ml, quedando restos de tejido en el homogenizador, de inmediato se vierten 3 ml de solución fisiológica (0.9%) al homogenizador para lavarlo durante 2 minutos, esta muestra es vaciada con todo el resto de tejido al tubo y se completa a 5 ml de muestra para luego guardarla 24 horas a 5°C, para permitir la liberación de los espermatozoides de las paredes del tejido epididimario.

La solución refrigerada se diluye en la proporción de 1:2 con una solución de eosina al 2 por mil, de esta dilución se extraen 10 ul y se mezclan con 20 ul de solución de eosina para hacer una nueva dilución de 1:3. Se vierte una gota de la dilución en la cámara de Neubauer. Se cuentan 25 cuadrados del campo central de la cámara de Neubauer. El valor de espermatozoides se multiplica por el factor 0.06 y los resultados se expresan en $\times 10^6$ espermatozoides.

VI. 9. MOVILIDAD DE LOS ESPERMATOZOIDES

La movilidad de espermatozoides se realizó en la cauda (cola) del epidídimo izquierdo (13). Se procede haciendo un corte tangencial y se aspira con un tip la secreción del epidídimo, la que se coloca en 2 ml suero fisiológico al 0.9% (14-16) y se visualiza a 400X en un microscopio compuesto. Se cuentan los espermatozoides que se mueven y aquellos que no se mueven. La movilidad de los espermatozoides está referida en porcentaje y se calcula dividiendo el número de espermatozoides móviles sobre el número total de espermatozoides contados por cien.

VI. 10. ANALISIS DE RESULTADOS

Se codificaron las variables independientes y cada rata tuvo un número. Se preparó una base de datos en el programa Excel y se obtuvieron las medidas de tendencia central como medias aritméticas, y la desviación estándar de la población.

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Previamente se evaluó la homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett; si la muestra no es homogénea se procede a una transformación de los datos o a aplicar estadística no paramétrica (Wilcoxon). Para determinar diferencias entre pares de medias se utiliza la prueba de Scheeffé. Se considera significativa una diferencia cuando $p < 0.05$.

P: significancia

VII. RESULTADOS

VII. 1. Pesos de Testículos, Epidídimos y Vesículas Seminales

Al cabo de 7 días de tratamiento, se observa que el peso promedio del testículo izquierdo es significativamente mayor en el grupo tratado con maca negra ($P < 0.05$) en comparación con el control. No se observan diferencias entre los otros ecotipos y el control ($P: NS$) (Tabla 2). Después de 42 días de tratamiento, el peso promedio del testículo izquierdo fue similar en el grupo control y en cada uno de los tratamientos con maca ($P: NS$) (Tabla 3).

El peso del epidídimo izquierdo de la rata después de 7 días de tratamiento es mayor en el grupo que recibió maca roja que en el grupo control ($P < 0.05$). No se observan diferencias con los otros ecotipos de maca ($P: NS$) (Tabla 2).

A los 42 días de tratamiento, el peso del epidídimo es significativamente mayor en el grupo tratado con maca negra ($P < 0.01$) que en el grupo control. Con los otros ecotipos de maca no se encuentran diferencias con el control. ($P: NS$) (Tabla 3).

Sólo el grupo tratado con maca negra presenta un menor peso de las vesículas seminales luego de 7 días de tratamiento ($P < 0.01$). Al cabo de 42 días de tratamiento, las vesículas seminales del grupo tratado con maca roja se reducen a un tercio el valor del control ($P < 0.01$). Los otros grupos no mostraron diferencia significativa aunque las medias fueron más altas en el grupo de maca negra e intermedia en el grupo de maca amarilla (Tabla 3).

El peso testicular de las ratas tratadas con maca roja es significativamente menor que el de las ratas tratadas con maca negra ($P < 0.05$) (Tabla 3). Del mismo modo el peso del epidídimo de las ratas tratadas con maca roja es significativamente menor que el peso de la rata tratada con maca negra ($P < 0.01$) (Tabla 3).

P: NS no significativa

Tabla 2. Pesos testiculares, epididimales y de vesículas seminales en ratas macho tratadas con diferentes ecotipos de maca durante 7 días:

Ecotipo	Testículo izquierdo (g)	Epidídimo izquierdo (g)	Vesícula seminal (g)
Control	1.52 ± 0.03	0.39 ± 0.01	0.76 ± 0.11
Rojo	1.54 ± 0.04	0.45 ± 0.02**	1.13 ± 0.16
Amarillo	1.47 ± 0.08	0.38 ± 0.03	0.89 ± 0.08
Negro	1.62 ± 0.02**	0.39 ± 0.01	0.88 ± 0.06*

**P<0.05; * p<0.01 con respecto al grupo control. Los datos son promedios ± error Standard

GRAFICO 1
PESOS TESTICULARES

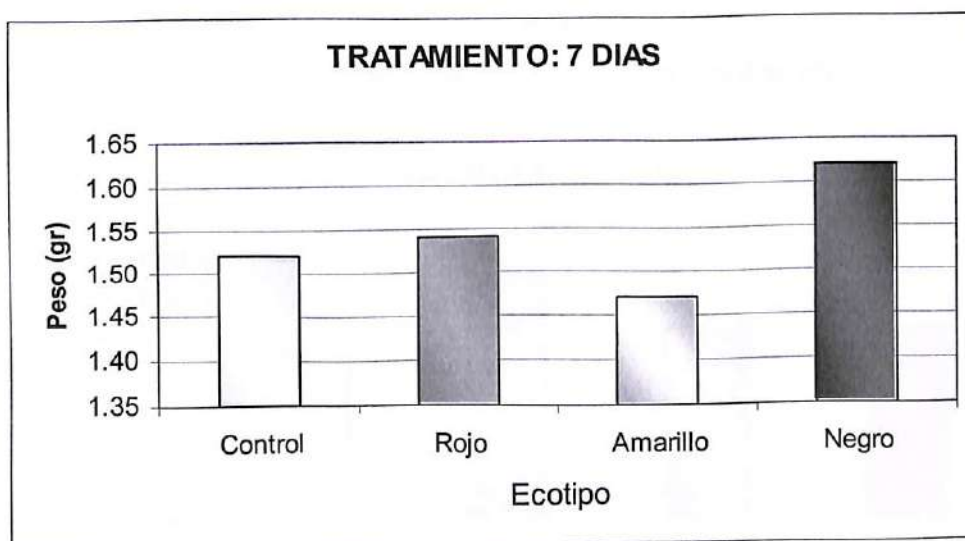


GRAFICO 2
PESOS DE EPIDIDIMOS

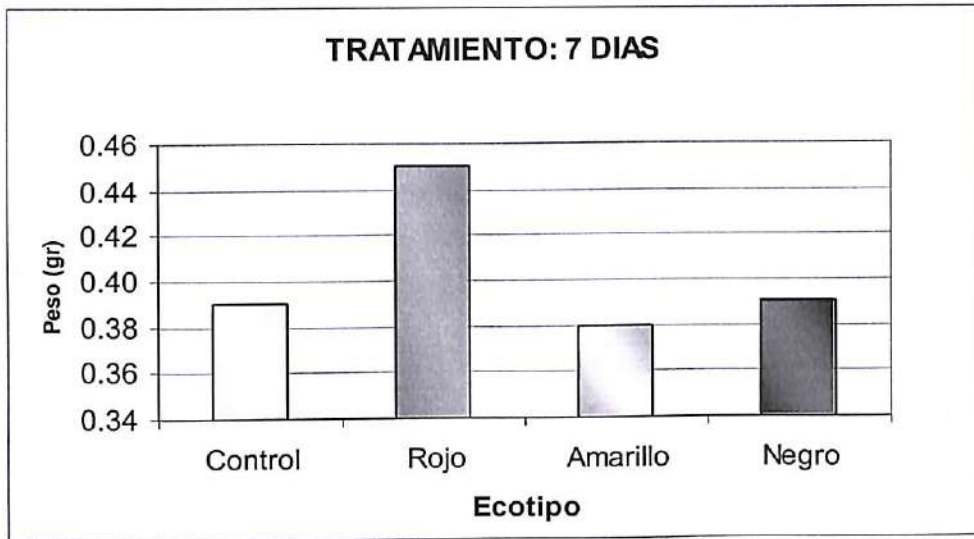


GRAFICO 3
PESOS DE VESICULAS SEMINALES

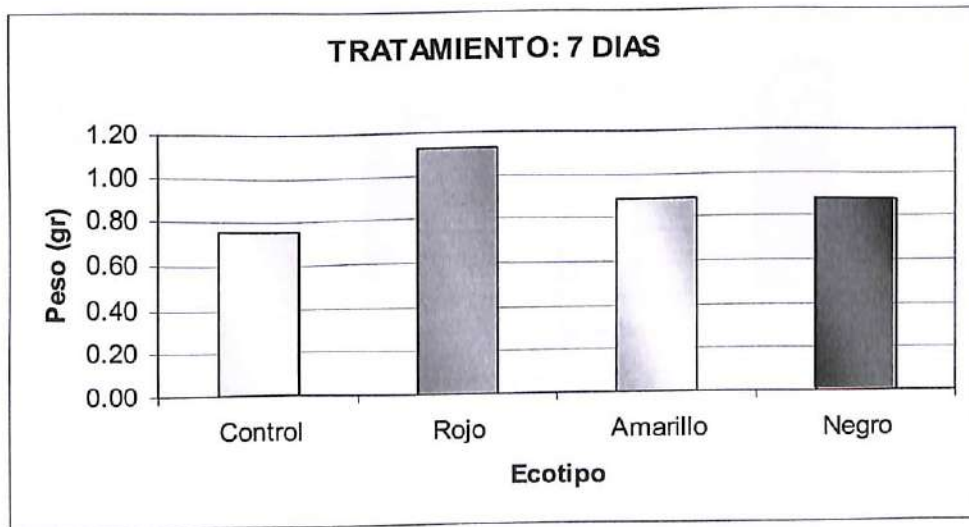


Tabla 3. Pesos testiculares, epididimales y de vesículas seminales en ratas macho tratadas con diferentes ecotipos de maca durante 42 días:

Ecotipo	Testículo izquierdo (gr)	Epidídimo izquierdo (gr)	Vesícula seminal (gr)
Control	1.55 ± 0.06	0.46 ± 0.02	0.89 ± 0.12
Rojo	1.40 ± 0.09	0.42 ± 0.02	0.31 ± 0.10*
Amarillo	1.52 ± 0.09	0.44 ± 0.02	0.62 ± 0.09
Negro	1.68 ± 0.03	0.54 ± 0.01*	1.05 ± 0.08

- $p < 0.01$ con respecto al grupo control. Los datos son promedios ± error estándar. El peso testicular ($P < 0.05$) y del epidídimo ($P < 0.01$) de la rata tratada con maca roja es menor que el de la rata tratada con maca negra.

GRAFICO 4
PESOS TESTICULARES

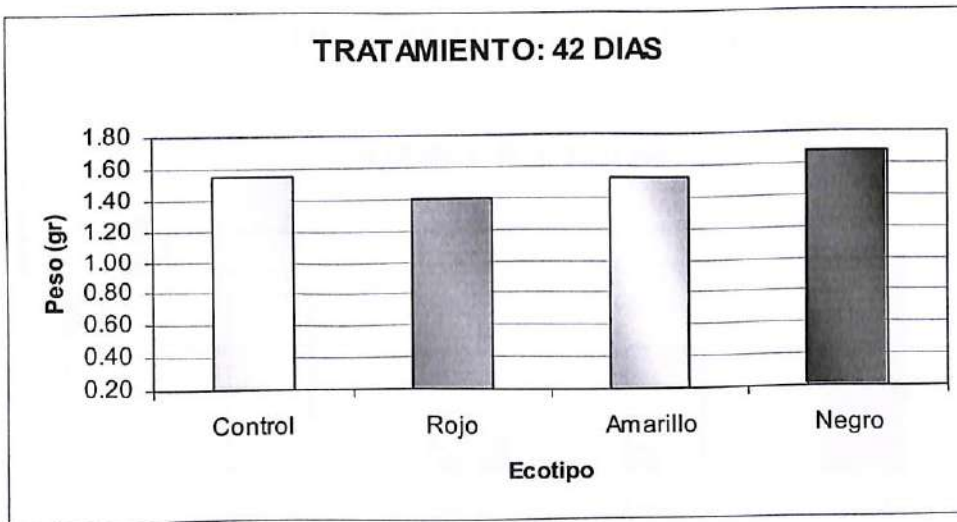


GRAFICO 5
PESOS EPIDIDIMOS

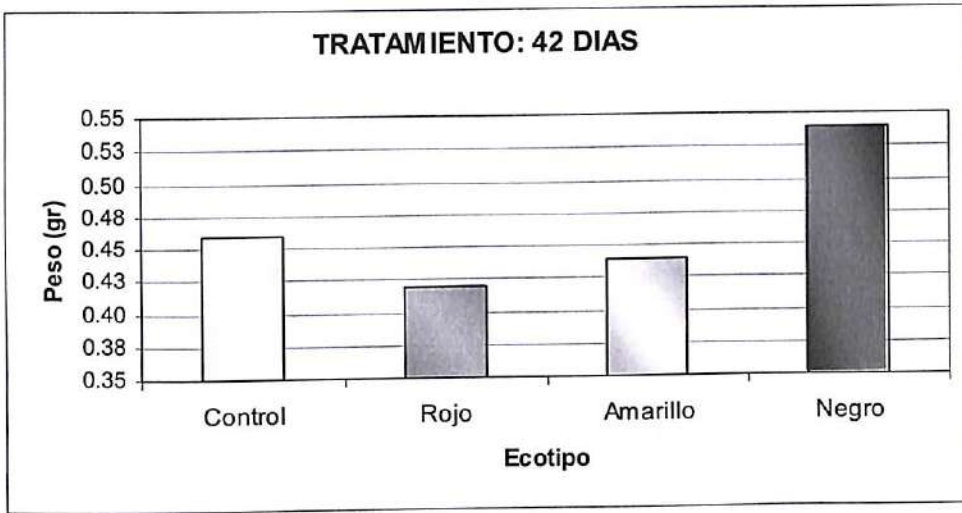


GRAFICO 6
PESOS VESICULAS SEMINALES



VII. 2. Estadíos del Epitelio Seminífero

Después de 7 días de tratamiento se puede apreciar que la longitud (cm) del estadio VIII de la espermatogénesis, es mayor en las ratas tratadas con maca negra ($P < 0.01$). La longitud de los estadios VI y XIII-XIV no fueron diferentes entre grupos (Tabla 4). El estadio VIII fue significativamente mayor en el grupo tratado con maca negra ($P < 0.01$) que en el control. Con la maca roja se incrementó el estadio XIII-XIV ($P < 0.05$).

Tabla 4. Estadíos del epitelio del túbulo seminífero en ratas macho tratadas con diferentes ecotipos de maca durante 7 días:

Ecotipo	VI (%)	VIII (%)	XIII-XIV (%)
Control	12.16 ± 0.81	2.87 ± 0.25	4.39 ± 0.59
Rojo	9.48 ± 1.17	2.40 ± 0.21	5.17 ± 0.40**
Amarillo	10.91 ± 0.82	3.55 ± 0.46	3.83 ± 0.63
Negro	11.21 ± 1.41	3.83 ± 0.30*	4.58 ± 1.11

Los datos son medias ± error standard * $p < 0.01$ con respecto al control ** $p < 0.05$

GRAFICO 7



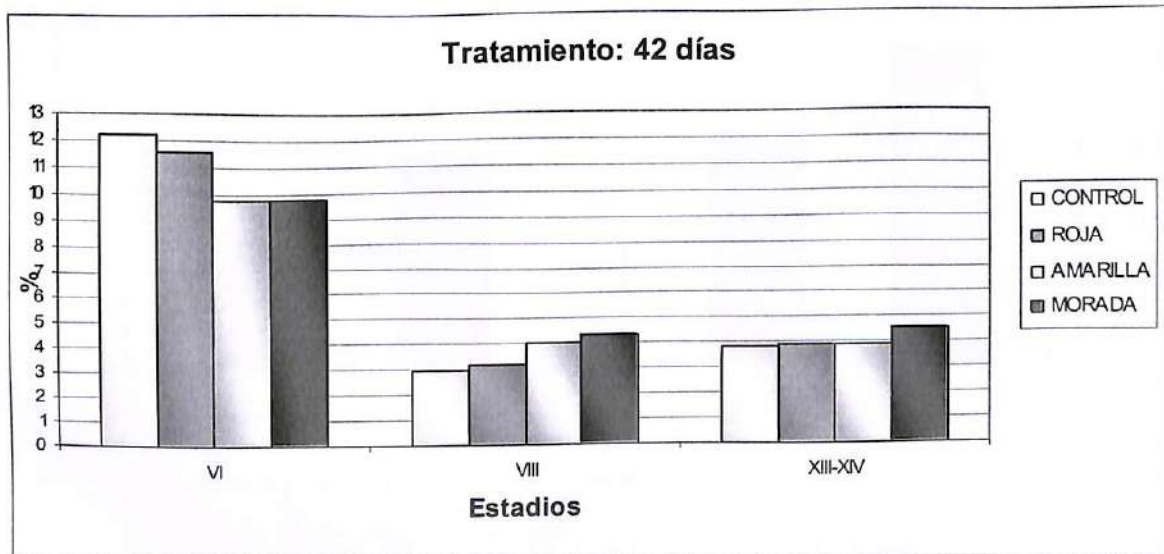
A los 42 días de tratamiento, la longitud del estadio VIII es mayor en los grupos tratados con maca amarilla y negra en comparación al control. El efecto es mayor en las ratas tratadas con maca negra, y con la amarilla ($P < 0.01$) respecto al control. El mayor promedio de longitud de estadio VIII se observó con la maca negra (Tabla 5). Las longitudes en ratas tratadas durante 42 días con maca roja fueron similares al control ($P: NS$). La longitud del estadio VI fue similar entre los grupos tratado con diferentes ecotipos de maca y el control (Tabla 5).

Tabla 5. Estadios del epitelio del túbulo seminífero en ratas macho tratadas con diferentes ecotipos de maca durante 42 días:

Ecotipo	VI (%)	VIII (%)	XIII-XIV (%)
Control	12.19 ± 0.93	2.95 ± 0.19	3.82 ± 0.42
Rojo	11.57 ± 0.43	3.19 ± 0.19	3.90 ± 0.47
Amarillo	9.76 ± 0.65	3.99 ± 0.16*	3.90 ± 0.60
Negro	9.76 ± 1.15	4.32 ± 0.35*	4.56 ± 0.94

* media ± ES * $p < 0.01$ con respecto al grupo control

GRAFICO 8



VII. 3. Motilidad Espermática en Epidídimo

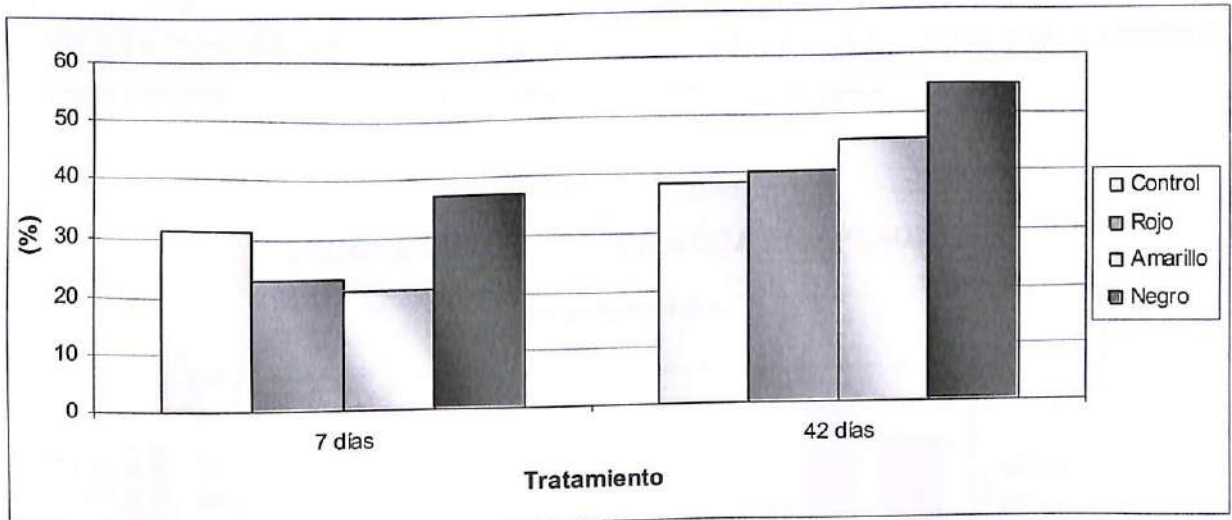
A los 7 días de tratamiento con maca no se observan cambios en la movilidad de los espermatozoides de la cola del epidídimo (Tabla 6), en cambio a los 42 días de tratamiento se observa un incremento de la movilidad de los espermatozoides sólo en el grupo tratado con maca negra (Tabla 6). En los otros grupos no se observan diferencias (Tabla 6).

Tabla 6. Motilidad espermática (%) en epidídimo de ratas macho tratadas con diferentes ecotipos de maca durante 7 días.

Ecotipo	7 días (6)	42 días (6)
Control	31.30 ± 8.76	38.31 ± 5.25
Rojo	23.18 ± 3.17	40.20 ± 5.57
Amarillo	20.87 ± 2.12	45.19 ± 3.51
Negro	36.86 ± 1.46	54.71 ± 3.13**

** $p < 0.05$ con respecto al control, maca roja y amarilla. El número de ratas por grupo se encuentra entre paréntesis.

GRAFICO 9
% MOTILIDAD



VII. 4. Conteo de Espermatozoides en Epidídimo

A los 7 días de tratamiento se observa un aumento significativo en el conteo de espermatozoides en el epidídimo en las ratas tratadas con maca roja ($P < 0.01$), amarilla ($P < 0.05$) y negra ($P < 0.05$). No se encuentran diferencias entre grupos de ecotipos de maca. Cuando se analiza el conteo de espermatozoides en cada una de las secciones del epidídimo se encuentra que la maca roja incrementa el número de espermatozoides en la cabeza/cuerpo (caput/corpus) del epidídimo, en tanto que la maca negra aumenta el conteo de espermatozoides particularmente en la cola (cauda) del epidídimo. Con la maca amarilla el incremento es uniforme en la cabeza/cuerpo y en la cola (Tabla 7)

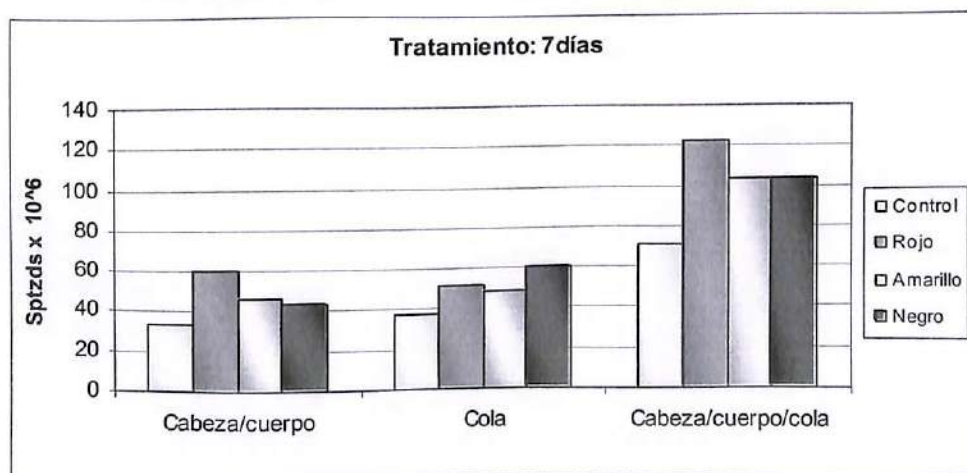
Tabla 7. Conteo de espermatozoides en epidídimo ($\times 10^6$) en ratas macho tratadas con diferentes ecotipos de maca durante 7 días:

Ecotipo	Cabeza/cuerpo ($\times 10^6$)	Cola ($\times 10^6$)	Cabeza/cuerpo/cola ($\times 10^6$)
Control	34.00 ± 5.37 (6)	37.02 ± 4.74 (6)	71.02 ± 8.95 (6)
Rojo	$60.17 \pm 6.35^*$ (5)	50.92 ± 6.39 (5)	$121.81 \pm 5.33^*$ (5)
Amarillo	46.37 ± 6.34 (4)	47.98 ± 9.46 (4)	$103.42 \pm 8.99^{**}$ (4)
Negro	43.13 ± 3.27 (6)	$60.39 \pm 6.34^*$ (6)	$103.52 \pm 8.74^{**}$ (6)

* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$ con respecto al grupo control. Los datos son medias \pm error standard.

Entre paréntesis se encuentra el número de animales por grupo.

GRAFICO 10
CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA EN EPIDIDIMO



Con 42 días de tratamiento se observa que las ratas tratadas con maca amarilla ($P < 0.05$) y maca negra ($P < 0.01$) son las únicas que incrementan el conteo de espermatozoides en epidídimo. Las ratas tratadas con maca roja no incrementó las cuentas de espermatozoides en epidídimo (Tabla 8).

El análisis diferencial en cabeza/cuerpo y cola muestra que la maca amarilla favorece el conteo de espermatozoides en la cola del epidídimo, en tanto que la maca negra incrementa tanto la concentración de espermatozoides tanto en la cabeza/cuerpo ($P < 0.01$) del epidídimo como en la cola del epidídimo ($P < 0.01$) comparado con lo que se observa en el grupo control (Tabla 8)

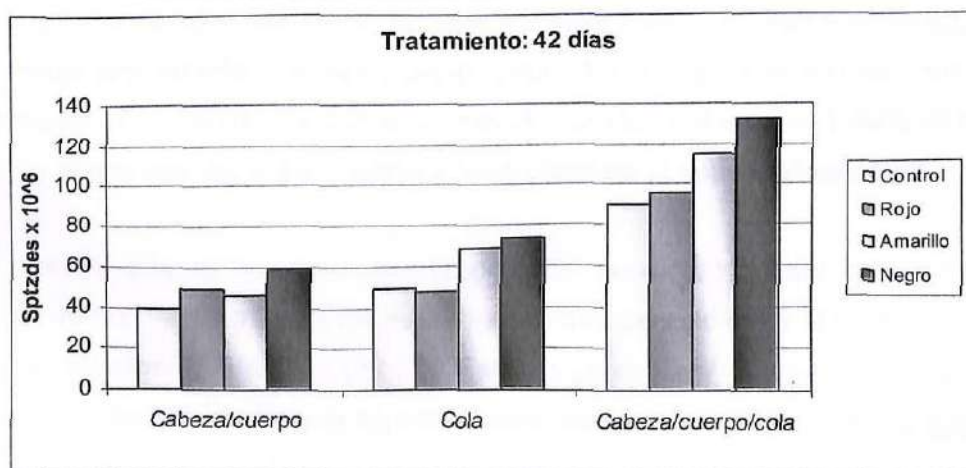
Tabla 8 Conteo de espermatozoides en epidídimo ($\times 10^6$) en ratas macho tratadas con diferentes ecotipos de maca durante 42 días:

Ecotipo	Cabeza/cuerpo ($\times 10^6$)	Cola ($\times 10^6$)	Cabeza/cuerpo/cola ($\times 10^6$)
Control	39.91 \pm 4.14 (5)	49.7 \pm 4.67 (5)	89.62 \pm 6.95 (5)
Rojo	48.79 \pm 5.13 (6)	46.85 \pm 6.38 (6)	95.64 \pm 7.94 (6)
Amarillo	46.04 \pm 2.38 (5)	68.39 \pm 7.46** (5)	114.43 \pm 8.39** (5)
Negro	59.35 \pm 3.25* (6)	73.29 \pm 5.96* (6)	132.64 \pm 6.68* (6)

* $P < 0.01$; ** $P < 0.05$ con respecto al grupo control. Los datos son medias \pm error standard.

Entre paréntesis se encuentra el número de animales por grupo.

GRAFICO 11
CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA EN EPIDIDIMO



VIII. DISCUSION

Antes de proceder a la búsqueda de los principios activos de la maca es necesario aclarar algunos puntos pendientes. Uno de ellos es determinar si el efecto en la espermatogénesis en la rata está ocurriendo realmente o si solo es un efecto temporal. La espermatogénesis en la rata tiene una duración de 42-45 días basado en una duración de cada ciclo espermatogénico de 12.9 días y 3-3.5 ciclos por proceso espermatogénico (19-21). Los estudios realizados previamente sólo abordan a evaluar el efecto hasta 21 días (18). Igualmente se sabe que la maca se presenta en diferentes variedades diferenciadas por el color de la raíz, denominados ecotipos (7-9). Es preciso si los diferentes ecotipos de la maca producen respuestas similares o diferentes en los parámetros reproductivos. El presente estudio ha sido diseñado para responder ambas interrogantes. Los estudios previos (5,6,18) han sido realizado utilizando la variedad amarilla que es la más frecuente y además preferida por la población, y es la que utilizan los laboratorios farmacéuticos en la preparación de sus productos de maca.

VIII. 1. EFECTO DE LA MACA SOBRE LA ESPERMATOGENESIS

Los resultados del presente estudio demuestran que la maca tanto amarilla como negra tienen un efecto real sobre la espermatogénesis aumentando el número de espermatozoides en epidídimo, luego de un tratamiento de 42 días que cubre el periodo de un proceso espermatogénico en la rata (19-21), lo que implicaría que la maca actúa tanto en la liberación de espermatozoides (espermiación) como se verifica en el incremento del conteo de espermatozoides en epidídimo después de 7 días de tratamiento, como en la renovación celular (inicio de un proceso completo de espermatogénesis) al incrementar el conteo de espermatozoides luego de 42 días de tratamiento. El tratamiento en humanos durante 4 meses con tabletas de maca gelatinizada (1.5-3.0 gramos/día) también demostró un incremento en el conteo de espermatozoides (6), con lo cual quedaría demostrado que la maca tiene un efecto real en la producción y progresión de la espermatogénesis.

Es posible que la mayor concentración de espermatozoides en epidídimo sea consecuencia de un menor tránsito de espermatozoides de epidídimo al conducto deferente como sucede con otras sustancias (22,23). Esto no parece ser el caso de la maca puesto que el peso testicular se incrementa significativamente luego de 42 días de tratamiento con

maca negra, igualmente aumenta el peso del epidídimo y la movilidad de espermatozoides. Cuando hay retardo en el tránsito con aumento de espermatozoides en epidídimo como en el caso de uso de bloqueadores alfa adrenérgicos no se observa modificación de la movilidad de los espermatozoides (22). En nuestro estudio se observa que la maca negra luego de ser administrada durante 42 días favorece la movilidad de los espermatozoides.

El hecho de que la concentración de espermatozoides en epidídimo aumenta tan temprano como a los 7 días de tratamiento con maca sugiere un efecto sobre la liberación de espermatozoides de los túbulos seminíferos hacia el epidídimo, sin que ello signifique necesariamente que aumente la producción, puesto que la espermatogénesis dura 42 días en la rata. A los 7 días de tratamiento habría un aumento en la espermiación lo que permite liberar espermatozoides a la luz del túbulo y de allí transportarlo al epidídimo. El aumento de espermatozoides se va a mantener debido a que también se incrementa los estadíos de espermiación (VII y VIII).

Los resultados a 42 días si son confirmatorios de que la maca aumenta también la espermatogénesis. Tanto es así que a los 7 días se observa aumento en la cantidad de espermatozoides en epidídimo con los tres ecotipos de maca estudiados: roja, amarilla y negra; sin embargo cuando se evalúa el efecto a los 42 días luego de completar todo un proceso espermatogénico se observa que sólo la maca amarilla y la negra tienen un efecto sobre la producción de espermatozoides.

Lo anterior sugiere que la maca puede tener al menos dos principios activos que favorecen la el aumento en el conteo de espermatozoides en el epidídimo, uno que se encuentra en los 3 ecotipos estudiados y que favorece la liberación de espermatozoides hacia el epidídimo (espermiación) y que se observa luego de 7 días de tratamiento; el segundo principio activo se encontraría sólo en la maca amarilla y en la maca negra y que favorecería la producción de espermatozoides. De acuerdo a los resultados la mayor actividad de este último principio se encontraría en la maca negra.

VIII. 2. EFECTO DE LOS ECOTIPOS SOBRE PARÁMETROS REPRODUCTIVOS

Nuestros resultados muestran que hay diferencias en la respuesta biológica de los tres ecotipos estudiados particularmente en lo referente al tracto reproductivo masculino.

El ecotipo negro después de 7 días de tratamiento produce un peso para epidídimos y vesículas seminales significativamente menor comparado con el control, mientras que después de 42 días de tratamiento los pesos de epidídimos y vesículas seminales resultaron ser mayores en comparación con el control.

A diferencia de los grupos tratados con ecotipo negro, los grupos tratados con ecotipo rojo, después de 7 días de tratamiento presentan un mayor peso de epidídimo y de vesículas seminales en comparación con el control.

El mayor peso de epidídimo puede explicarse por la mayor cantidad de espermatozoides en epidídimo, o por una actividad similar a andrógenos, puesto que tanto el epidídimo como las vesículas seminales son andrógenos dependientes; sin embargo después de 42 días de tratamiento muestran una *disminución significativa en los pesos del epidídimo y la vesícula seminal en comparación con el control*. Las vesículas seminales, órganos andrógeno dependientes, disminuyen su peso en presencia de estrógenos (24).

Se ha demostrado que la maca posee saponinas (25)(44-45). Las saponinas tienen un efecto estimulador androgénico, y favorecen el aumento del conteo de espermatozoides en humanos (26). Este efecto temprano observado a los 7 días con la maca roja podría deberse a una acción de saponinas. Sin embargo también se ha demostrado que las saponinas tienen un efecto antiproliferativo (27), y que este sería el efecto por el cual disminuye el peso testicular, de epidídimo y de vesículas seminales luego de 42 días de tratamiento con la maca roja.

La maca también contiene esteroides, tales como campesterol, estigmasterol y beta-sitosterol (4). Los fitoesteroides tienen también propiedades anticarcinogénicas (28), así como antioxidantes (29). Esta acción no parece ser debido a actividad estrogénica alguna, pues no se ha demostrado que los fitoesteroides tengan dicha propiedad (30).

La maca como todas las crucíferas contiene en su composición fitoquímica glucosinatos que varían en su concentración dentro de una misma variedad (31). Los glucosinatos han demostrado tienen un rol importante en la prevención del cáncer de próstata (32,33) y podrían estar relacionados con la disminución en el peso de las vesículas

seminales por acción de la maca roja. Esto nos abre a una línea de investigación importante puesto que diferencialmente habrían diferentes metabolitos secundarios en la maca dependiendo del ecotipo estudiado.

El ecotipo negro es el más efectivo en términos de efectos sobre el tracto reproductivo, puesto que luego de 42 días de tratamiento produce un mayor peso testicular, de epidídimo, aumenta más la longitud del estadio VIII de la espermatogénesis, aumenta la concentración y la movilidad de los espermatozoides en epidídimo convirtiéndose en un excelente candidato para estudios de manejo de infertilidad masculina. Su efecto es también rápido pues favorece la liberación de espermatozoides a la luz del túbulo seminífero y al epidídimo, como podemos observarlo en el aumento de la longitud del estadio VIII correspondiente a la espermiación y el conteo de espermatozoides en epidídimo a los 7 días de tratamiento.

El ecotipo amarillo favorece también la espermiación a los 7 días (estadio VII), y a los 42 días de tratamiento (estadio VIII). Igualmente mejora la concentración de espermatozoides en epidídimo al cabo de 42 días de tratamiento.

Podemos decir que el ecotipo negro es más efectivo ya que presenta un mayor efecto biológico que la maca amarilla. Es posible que el efecto sobre el conteo de espermatozoides puede en parte ser mediado por una reducción en la apoptosis de las células germinales, con lo que se haría más eficiente la espermatogénesis. Sandoval y col (34) han demostrado que la maca actúa inhibiendo la apoptosis inducida por peroxinitrito en una línea celular de macrófagos. Es probable que en los túbulos Seminíferos donde hay una importante actividad apoptótica (35), actúe la maca inhibiendo la misma.

La maca negra, favorece significativamente la motilidad espermática en la cola del epidídimo. Este efecto sólo se ve a los 42 días de tratamiento y no a los 7 días. Conforme el espermatozoide migra por el epidídimo va adquiriendo su capacidad funcional para fertilizar. Ello implica su capacidad de movilizarse y su potencialidad para capacitarse (36).

Estudios realizados en otras especies de Brassicaceae han demostrado que el extracto de ésta planta incrementa significativamente la concentración y motilidad espermática sin producir ningún efecto espermatotóxico (37); también se ha demostrado que

la presencia de isoflavonoides favorece estas mismas variables tanto en humanos (38) como en equinos (39). La presencia de isoflavonoides en la maca (44-45) podría explicar el incremento en la motilidad y concentración espermática.

Aunque el presente estudio se ha abocado a tres ecotipos de la maca, existe una variedad mayor. En 1992, Tello y col (40) identificaron 13 diferentes ecotipos, que varían de blanco a negro, en una muestra de 758 raíces de maca del departamento de Junín. El más frecuente fue el ecotipo amarillo (47.8%). La maca es caracterizada por su alto contenido nutricional (41), por lo que no se debe descartar también que basado en sus componentes primarios podría afectar favorablemente la fertilidad. Estudios de los componentes nutricionales de los ecotipos de la maca no muestran marcadas diferencias según lo han descrito diversos autores. El contenido de proteínas entre maca clasificada como clara y oscura fue similar (42). Yllescas (42) ha descrito los componentes fitoquímicos de tres ecotipos de la maca: amarilla, roja y negra en las zonas de Carhuamayo. Estos tres ecotipos son los mismos presentados en el presente estudio. Según Yllescas no hay diferencias en los patrones fitoquímicos de los tres ecotipos, pero un análisis de sus datos revelan algunas diferencias. Por ejemplo el porcentaje de proteínas puras fue de 7.7% en la maca negra, 8.25% en la maca amarilla y 9.97 en la maca roja. Igualmente el porcentaje de azúcares solubles reductores indirectos es de 7.02% en la maca negra, 6.17 en la maca amarilla y 6.03 en la maca roja. El contenido de riboflavina fue de 0.76 gr% en la maca negra, 0.61 gr% en la maca amarilla y 0.5 g% en la maca roja. Otra diferencia entre ecotipos fue visto para el contenido de potasio siendo de 1000 mg% en la maca negra, 1130 en la maca amarilla y 1160 en la maca roja. Estos datos nos indican que efectivamente hay diferencias entre los ecotipos y que estas diferencias deben también implicar diferencias en sus efectos biológicos.

De nuestros resultados podemos decir que la maca negra favorece los parámetros reproductivos siendo una alternativa para el tratamiento de la infertilidad masculina; mientras que la maca roja al poseer una actividad de reducir el peso de las vesículas seminales, y al compartir esta glándula una serie de similitudes con el control del crecimiento de la próstata, es que se podría pensar en la prevención de cáncer de próstata; sin embargo ello requerirá de nuevos trabajos de investigación.

IX. CONCLUSIONES

1. Se observan diferencias en los parámetros reproductivos entre los diferentes ecotipos de la maca tanto a los 7 como a los 42 días de tratamiento.
2. La maca negra durante un tratamiento que cubre el periodo de espermatogénesis de la rata (42 días) tiene la mejor eficacia en los parámetros reproductivos en la rata macho incrementando el peso testicular y el de epidídimos en un 15% comparado con el control.
3. La maca negra aumenta en un 32% el estadio VIII de espermiación con respecto al control
4. El conteo de espermatozoides en epidídimo aumenta un 32% en comparación con el grupo control en ratas tratadas con maca negra por un periodo de tratamiento de 42 días.
5. La maca negra favorece la movilidad de espermatozoides, en las ratas tratadas con maca negra después de un tratamiento de 42 días, en un 32% en comparación con el control.
6. La maca roja, después de un tratamiento de 42 días, tiene un efecto inhibitorio sobre el peso de las vesículas seminales disminuyendo su peso al tercio en comparación con el control y del epidídimo disminuyéndolo en un 15%.
7. La maca amarilla tiene un efecto intermedio en los parámetros reproductivos entre la maca roja y la maca negra.

X. REFERENCIAS

1. Chacon G. (1961). Estudio fitoquímico de *Lepidium meyenii Walp.* Tesis de Bachiller en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias de la Universidad Mayor de San Marcos. Lima.
2. Cabieses F. (1997). La maca y La Puna. Universidad Mayor de San Marcos. Lima.
3. Pulgar Vidal, J. (1978). La maca y el uso de la región Puna. Expreso 04-07-1978, pag.18 (Recursos Naturales VIII). Lima.
4. Zheng BL, He K, Kim Ch, Rogers L, Shao Y, Huang ZY, Lu Y, Yan SJ, Quien LC, Zheng QY. (2000) Effect of lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. Urology 55:598–602.
5. Gonzales, GF; Ruiz, A., Gonzales C., Córdova A., Villegas, L.(2001). Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. Asian Journal of Andrology 3 (3):161-240.
6. Gonzales, GF; Cordova A., Gonzales C., Chung A., Vega K., Villena A. (2001a). *Lepidium meyenii* (maca) improved semen parameters in adult men. Asian Journal of Andrology 3 (4):241-320.
7. Beltrán, H; Baldeón, S; Carrillo, E; Fuertes, C; Arroyo, J; Sandoval, S; Obregón, L. (1997). estudio Botánico y Químico de los ecotipos amarillo y negro de *Lepidium peruvianum*: "maca". Evaluación en su toxicidad aguda. Universidad Mayor de San Marcos, Instituto de Fitoterapia Americano.
8. Obregon Vilches L (1998). maca. Planta Medicinal y Nutritiva del Perú. Instituto de Fitoterapia Americano, Lima, Perú.
9. Ponce Aguirre, D. (1995). Estimación de la variabilidad genotípica en una población de maca (*Lepidium meyenii walp*) de fase generativa (reproductiva). Cultivos Andinos. Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Programas de Investigación en Cultivos Andinos. 5(1):8-9.
10. Almenara A, Escalante G, Gazzo E, Gonzales GF. (2001). Transillumination as a method to evaluate spermatogenesis: Effect of testosterone enanthate on spermatogenesis in adult male rats. Arch Androl 46 (1):21-7
11. Parvinen M (1982) Regulation of the seminiferous epithelium. Endocrine reviews 3(4):404-417.
12. Gonzales GF y Del Valle L (1995) Adult rat seminiferous tubules secrete a fraction greater than 30 Kda to regulate spermatogenesis. Human Reproduction 10: 1435-1443.

13. Hinton, BT; Doh, HM; Stchell, BP. (1979) Measurement of the motility of rat spermatozoa collected by micropuncture from the testis and from different region along the epididymis. *J. Reproduction Fertility* 55:167-172
14. Wyker, R; Howards, SS. (1977) Micropuncture studies of the motility of rete testis and epididymal spermatozoa. *Fertility and Sterility* 28:108
15. Jayram Verma, R. (2001) Sperm quiescence in cauda epididymis: a mini-review. *Asian Journal of Andrology* 3:181-183
16. Srikanth, V; Malini, T; Arunakaran, P; Govindarajulu, P; Balasubramanian, K. (1999) Effects of Ethanol Treatment on Epididymal Secretory Products and Sperm Maturation in Albino Rats. *Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288:509-515
17. Cobo B (1956) *Historia del Nuevo Mundo*. Ed. Francisco de Mateos. Madrid: Ediciones Atlas.
18. Gonzales GF, Rubio J, Chung A, Gasco M, Villegas L (2003) Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (maca) on testicular function in male rats. *Asian Journal of Andrology* 5: 349-352
19. França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD (1998) Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction* 59: 1371-1377.
20. Aslam H, Rosiepen G, Krishnamurthy H, Arslan M, Clemen G, Nieschlag E, Weinbauer GF. The cycle duration of the seminiferous epithelium remains unaltered during GnRH antagonist-induced testicular involution in rats and monkeys. *Journal of Endocrinology* 161: 281-288.
21. Peirce EJ, Breed WG (2001) A comparative study of sperm production in two species of Australian arid zone rodents (*Pseudomys australis*, *Notomys alexis*) with marked differences in testis size. *Reproduction* 121: 239-247.
22. Hibi H, Yamamoto M, Miyake K (1996) Effect of alpha-blockers on epididymal sperm concentration, motility and testicular productivity in the rat. *Hinyokika Kyo* 42: 357-360.
23. Kempinas W, Suarez JD, Roberts NL, Strader L, Ferrell J, Goldman JM, Klinefelter GR (1998) Rat epididymal sperm quantity, quality and transit time after guanethidine-induced sympathectomy. *Biology of Reproduction* 59: 890-896.
24. Skarda J. (2002) Sensitivity and Specificity of the Bioassay of Estrogenicity in Mammary Gland and Seminal Vesicles of Male Mice. *Physiological Research* 51: 267-276

25. Oshima M, Gu Y, Tsukada S (2003) Effects of *Lepidium meyenii* and *Jatropha macrantha* on Blood Levels of Estradiol-17 β , Progesterone, Testosterone and the Rate of Embryo Implantation in Mice. J. Vet. Med. Sci. 65(10): 1145-1146.
26. Salvati G, Genovesi G, Marcellini L, Paolini P, De Nuccio I, Pepe M, Re M. (1996) Effects of Panax Ginseng C.A. Meyer saponins on male fertility. Panminerva Med. 38(4):249-5
27. Liu WK, Xu SX, Che CT. (2000) Anti-proliferative effect of ginseng saponins on human prostate cancer cell line. Life Sci. 4;67:1297-306.
28. Muti P, Awad AB, Schunemann H, Fink CS, Hovey K, Freudenheim JL, Wu YW, Bellati C, Pala V, Berrino F. (2003) A plant food-based diet modifies the serum beta-sitosterol concentration in hyperandrogenic postmenopausal women. J Nutr. 133:4252-5
29. Yoshida Y, Niki E. (2003) Antioxidant effects of phytosterol and its components. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo). 49(4):277-80.
30. Baker VA, Hepburn PA, Kennedy SJ, Jones PA, Lea LJ, Sumpter JP, Ashby J. (1999) Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo and in vitro assays. Food Chem Toxicol. 37(1):13-22.
31. Piacente S, Carbone V, Plaza A, Zampelli A, Pizza C (2002) Investigation of the Tuber Constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.). Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 5621-5625.
32. Cohen JH et al (2000). Fruit and vegetable intakes and prostate cancer risk. J Natl Cancer Inst 92:61-68
33. Kristal AR, Lampe JW. (2002) Brassica vegetables and prostate cancer risk: a review of the epidemiological evidence. Nutr Cancer. 42:1-9.
34. Sandoval M, Okuhama N, Angeles F, Melchor V, Condezo LA, Lao J, Miller M (2002) Anti-oxidant activity of the cruciferous vegetable maca (*Lepidium meyenii*). Food Chemistry 70: 70-76
35. Johnson L. Efficiency of spermatogenesis. Microsc Res Tech 32; 385-422.
36. Lewis B, Aitken RJ. (2001) Impact of epididymal maturation on the tyrosine phosphorylation patterns exhibited by rat spermatozoa. Biol Reprod. 64:1545-56.
37. Qureshi S, Shah AH, Tariq M, Ageel AM. (1989) Studies on herbal aphrodisiacs used in Arab system of medicine. Am J Chin Med. 17:57-63.
38. Mitchell J, cawood E, Kinniburgh D, Provan A, Collins A, Irvine S (2001) Effect of a Phytoestrogen Food Supplement on Reproductive Health in Normal Males. Clinical science. 100: 613-618.

39. Woodward A, Ericsson S, Phurdy P, Fox M, (2000) Effect of the flavonoid catechin or epicatechin on the motility of extended cooled equine spermatozoa. J. Anim. Sci. Vol. 78, Suppl. 1/J. Dairy Sci. 83, Suppl. 1:
40. Tello J, Hermann M, Calderón A (1992) La maca (*Lepidium meyenii* Walp) Cultivo alimenticio potencial para las zonas altoandinas. Boletín de Lima 14: 59-66
41. Dini A, Migliuolo G, Rastelli L, Saturnino P, Schettino P (1994) Chemical composition of *Lepidium meyenii*. Food Chemistry 49:347-349
42. Torres Villanueva R (1984) Estudio nutricional de la maca (*Lepidium meyenii* Walp) y su aplicación en la elaboración de una bebida base. Tesis Facultad de Ingeniería en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria. Lima, Perú.
43. Illescas M (1994) Estudio químico y Fisicoquímico de tres ecotipos de *Lepidium meyenii* procedentes de Carhuamayo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú
44. Kateřina Valentová, Jitka Ulrichová (2003) Smallanthus Sonchifolius and *Lepidium Meyenii* – Prospective Andean Crops for the Prevention of Chronic Diseases. Biomed. Papers 147(2), 119–130
45. G. Menaldo, S. Serrano (2001) Improving pregnancy rates by means of polarized maca based phytoterapy and intratubal insemination. Controversies in Obstetrics Gynecology & Infertility.

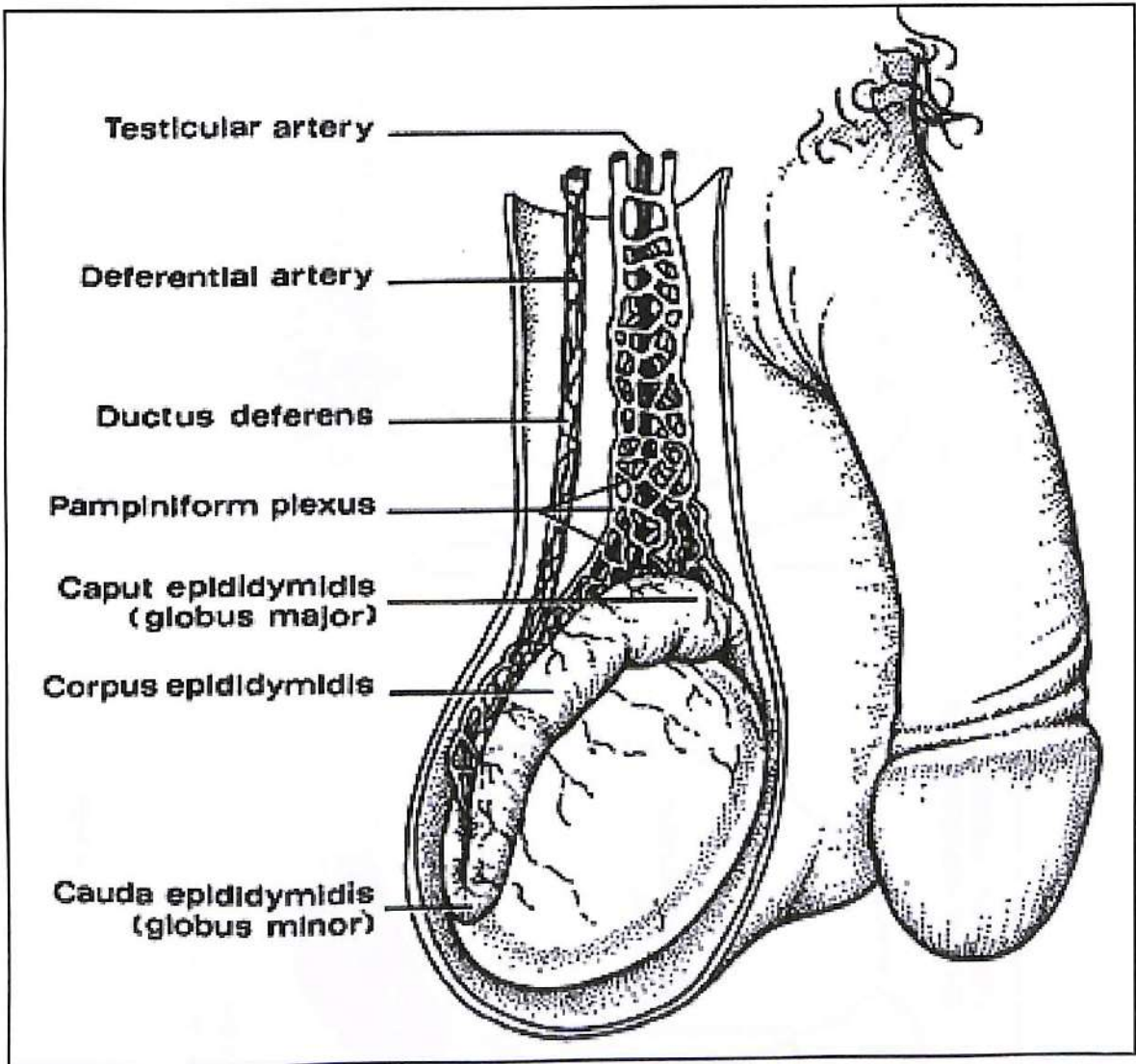
ANEXO 1



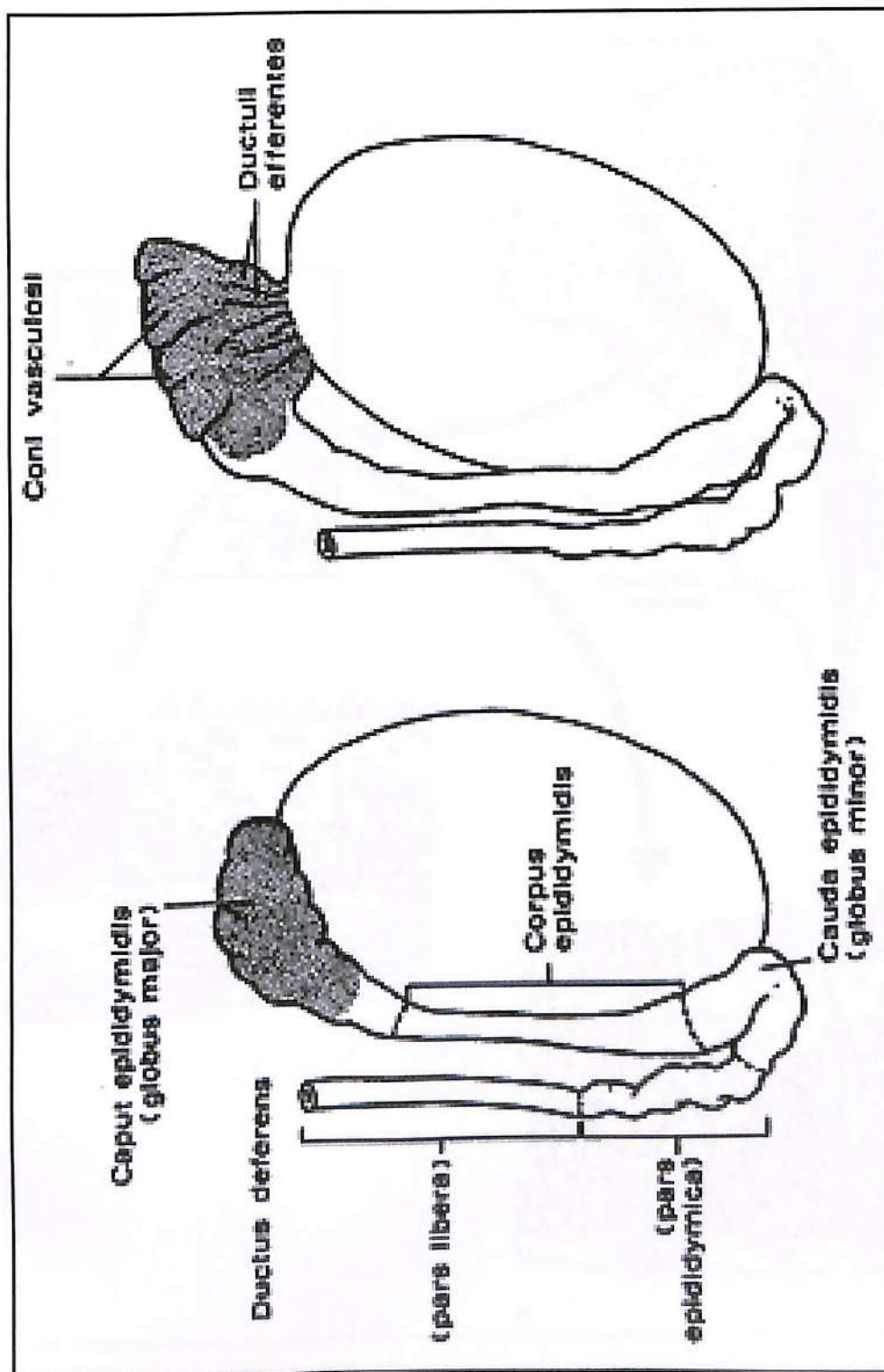
Foto 1. Diferentes ecotipos de maca. Roja, Amarilla y negra. Las raíces corresponden al término del periodo de secado natural.

ANEXO 2

UBICACIÓN ANATOMICA DEL TESTICULO

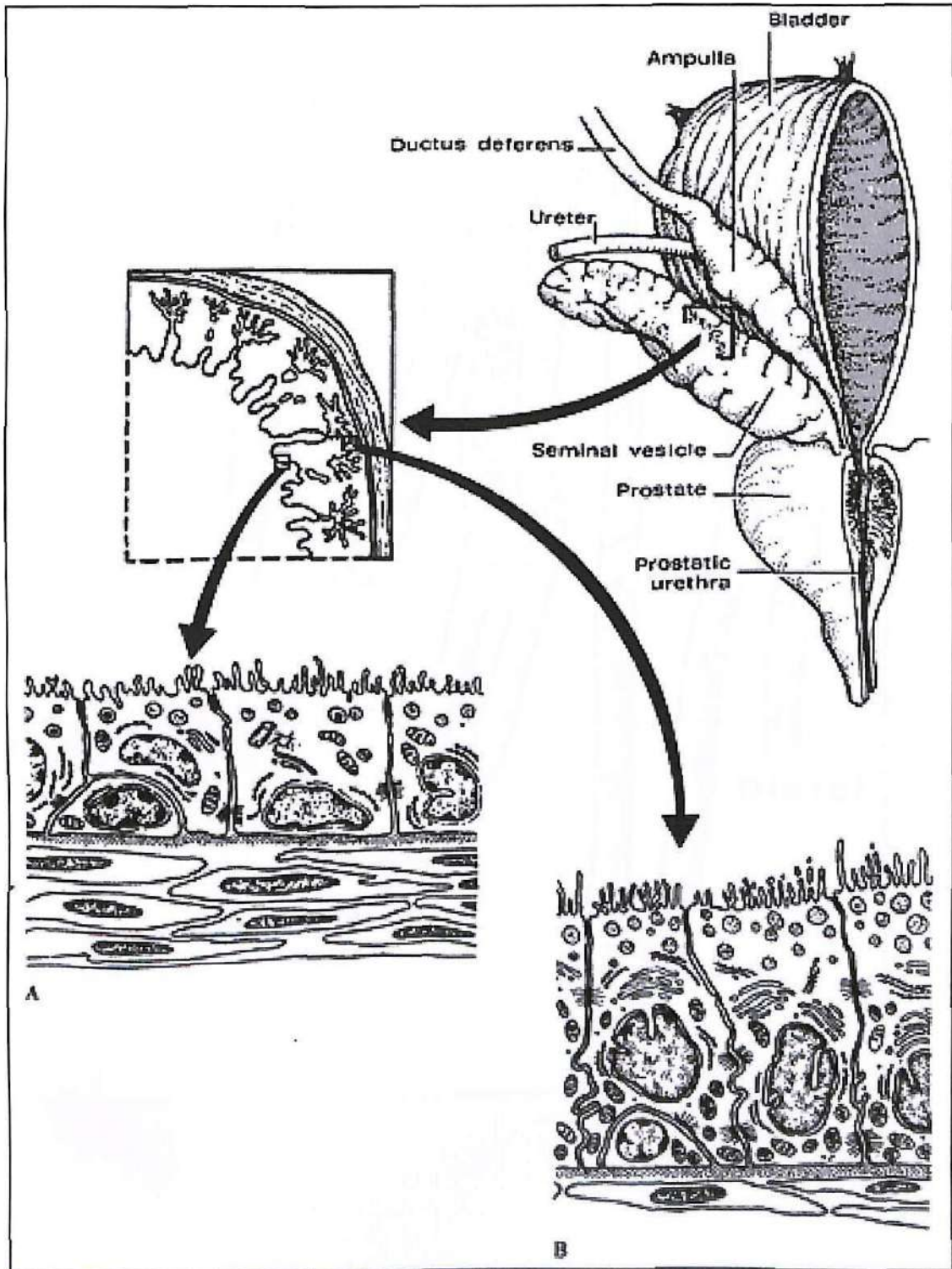


ANEXO 3
UBICACIÓN DEL EPIDIDIMO
SEÑALANDO SUS PARTES: CABEZA, CUERPO Y COLA



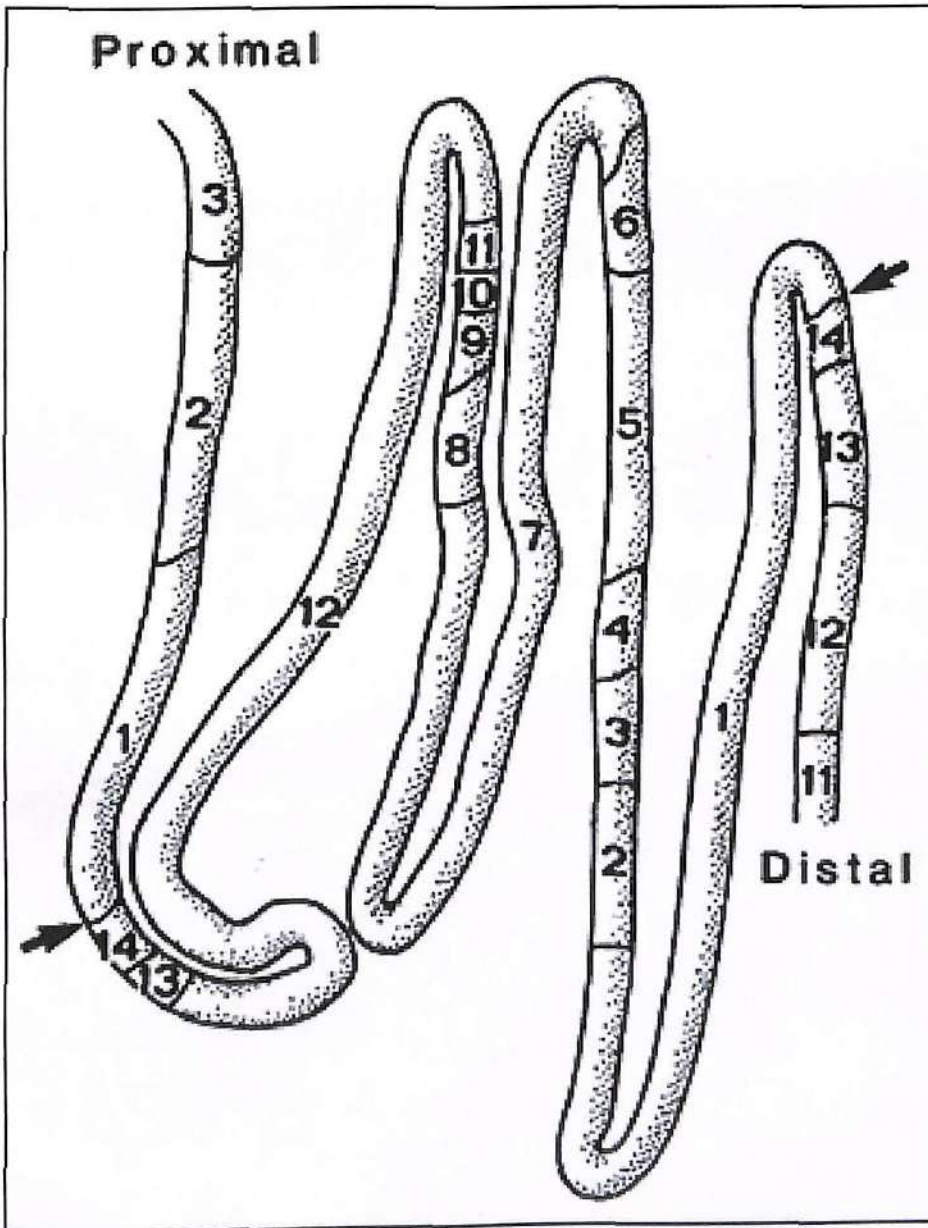
ANEXO 4

VESICULA SEMINAL



ANEXO 5

ESQUEMA: ESTADIOS DEL EPITELIO SEMINIFERO



ANEXO 6

ESTADIOS DEL EPITELIO SEMINIFERO TRANSILUMINACION

