



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias e Ingeniería

Efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja (*Lepidium meyenii*) sobre la histología ovárica en un modelo de ratas de la cepa Wistar inducidas a Síndrome de Ovario Poliquístico con valerato de estradiol y enantato de testosterona.

AUTOR:

Paula Alejandra Ricra Falla

Asesor:

Dr. Manuel Enrique Gasco Tantachuco

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Lima, Perú

2024

Efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja (Lepidium meyenii) sobre la histología ovárica en un modelo de ratas de la cepa Wistar inducidas a Síndrome de Ovario Poliquístico con valera

INFORME DE ORIGINALIDAD

13%	13%	5%	2%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	dspace.concytec.gob.pe Fuente de Internet	5%
2	1library.co Fuente de Internet	1%
3	www.researchgate.net Fuente de Internet	1%
4	hdl.handle.net Fuente de Internet	1%
5	issuu.com Fuente de Internet	<1%
6	stemcellres.biomedcentral.com Fuente de Internet	<1%
7	www.slideshare.net Fuente de Internet	<1%
8	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA	<1%

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. HIPÓTESIS.....	7
III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	7
IV. OBJETIVOS.....	8
i. General.....	8
ii. Específicos.....	8
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
i. Animales de experimentación.....	8
ii. Clasificación taxonómica.....	9
iii. Preparación del extracto hidroalcohólico de maca roja.....	9
iv. Frotis Vaginal.....	10
v. Diseño de investigación.....	12
vi. Tamaño de muestra.....	15
vii. Evaluación histológica del ovario y conteo folicular	15
viii. Análisis estadísticos.....	18
ix. Descripción de las variables	18
x. Consideraciones éticas.....	22
VI. RESULTADOS.....	22
i. Ciclo estral.....	22
ii. Peso de los animales.....	24
iii. Peso del útero	25
iv. Peso del ovario.....	26
v. Morfología ovárica.....	26
VII. DISCUSIÓN.....	31
VIII. CONCLUSIONES.....	35
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
X. ANEXOS.....	42

RESUMEN

El síndrome de ovario poliquístico (SOP) está caracterizado por un exceso de andrógenos, disfunción ovárica y morfología de ovario poliquístico. Los tratamientos dirigidos al SOP consisten en terapias farmacológicas que resultan en efectos secundarios desfavorables. Por ello, es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos con productos naturales, entre ellos el extracto de maca (*Lepidium meyenii*). Varios estudios han destacado su beneficio sobre la inflamación, fertilidad, osteoporosis, síntomas menopáusicos y balance de hormonas.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja (MR) sobre los cambios en la histología ovárica, peso corporal y peso del ovario en ratas hembras inducidas a SOP ocasionado por el valerato de estradiol (VE) y enantato de testosterona (ET). Se incluyeron 30 ratas hembras de 3 meses de edad con ciclos estrales regulares divididos en cinco grupos. Control: Ratas sanas, Grupo SOP: Ratas inducidas a SOP sin tratamiento, Grupo positivo: Ratas inducidas a SOP + pastillas anticonceptivas, Grupo SOP + MR40: Ratas inducidas a SOP con tratamiento de MR a dosis mínima y Grupo SOP + MR80: Ratas inducidas a SOP con tratamiento de MR a dosis mayor. Para la inducción de SOP, se administró una sola dosis de VE/ET i.m. Se realizaron frotis vaginales diarios hasta evidenciar una fase de diestro prolongado, luego de esto, se da por inicio el tratamiento respectivo. Se analizaron muestras histológicas de ovario, asimismo los órganos reproductivos y peso corporal de cada grupo.

Los ovarios de ratas inducidas a SOP presentaron una morfología poliquística. El tratamiento con MR diario a mayor dosis disminuyó significativamente el número de quistes ováricos y aumentó el número de cuerpos lúteo recién formados en comparación al grupo SOP. En conclusión, la administración de MR logró restaurar el tejido ovárico, teniendo un efecto sobre la función ovárica.

Palabras clave: Maca Roja, Síndrome de Ovario Poliquístico, Histología, Valerato de estradiol, Enantato de Testosterona, Wistar.

ABSTRACT

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is characterized by androgen excess, ovarian dysfunction, and polycystic ovary morphology. Treatments targeting PCOS consist of pharmacological therapies that result in unfavorable side effects. Therefore, it is necessary to search for new treatments with natural products, including maca extract (*Lepidium meyenii*). Several studies have highlighted its benefit on inflammation, fertility, osteoporosis, menopausal symptoms and hormone balance. The objective of the study was to evaluate the effect of atomized hydroalcoholic extract of red maca (RM) on changes in ovarian histology, body weight and ovary weight in female rats induced to PCOS caused by estradiol valerate (VE) and estradiol enanthate. Testosterone (ET). 30 3-month-old female rats with regular estrous cycles divided into five groups were included. Control: Healthy rats, PCOS Group: PCOS induced rats without treatment, Positive Group: PCOS induced rats + birth control pills, PCOS + MR40 Group: PCOS induced rats with MR treatment at minimum dose and PCOS + MR80 Group: Induced rats to PCOS with higher dose MR treatment. For PCOS induction, a single dose of VE/ET was administered i.m. Daily vaginal smears were performed until a prolonged diestrus phase was evident, after which the respective treatment began. Histological ovarian samples were analyzed, as well as the reproductive organs and body weight of each group. The ovaries of rats induced to PCOS presented a polycystic morphology. Treatment with daily MR at a higher dose significantly decreased the number of ovarian cysts and increased the number of newly formed corpora lutea compared to the PCOS group. In conclusion, the administration of MR managed to restore ovarian tissue, having an effect on ovarian function.

Keywords: Red Maca, Polycystic Ovary Syndrome, Histology, Estradiol Valerate, Testosterone Enanthate, Wistar.

I. INTRODUCCIÓN

El Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) es una condición endocrina, metabólica, reproductiva e inmunológica que afecta entre el 8% al 13% de mujeres en edad reproductiva, causando daños en la salud y aumentando la morbilidad [1]. En la actualidad, la definición de Rotterdam para la clasificación del SOP es ampliamente utilizada y propone que, para el diagnóstico de este síndrome, las mujeres deben presentar al menos dos de las tres características básicas: Hiperandrogenismo (clínico y/o bioquímico), disfunción ovárica y morfología de ovario poliquístico [2].

El hiperandrogenismo, el atributo más característico del SOP, representa alrededor del 60% de pacientes con niveles elevados de andrógenos circulantes como son la testosterona (T), androstenediona (A₄) y dehidroepiandrosterona (DHEAS), además de provocar manifestaciones cutáneas (hirsutismo, acné y alopecia) [2, 3]. Como consecuencia del hiperandrogenismo y otros mecanismos adyacentes, el ovario adquiere una morfología poliquística caracterizada por la acumulación de folículos ováricos en diferentes etapas de maduración y/o atresia [4]. Esto conduce al desarrollo de quistes, sacos membranosos o cavidades de carácter anormal que contienen líquido, lo cual previene la ovulación. Esto desencadena una disrupción del ciclo menstrual causando anovulación. Entre otros aspectos del ovario poliquístico, se observa un volumen de ovario agrandado ($\geq 10\text{ml}$) [2, 5].

La fisiología reproductiva está dirigida por una serie de procesos controlados por el eje Hipotálamo-Pituitario-Gonadal (HPG). Este eje involucra la liberación de las hormonas GnRH, LH y FSH que, a nivel ovárico, actúan sobre el crecimiento folicular, ciclo menstrual y ovulación [6] (Anexo N°1). En contraste, el Síndrome de Ovario Poliquístico está representado por una pulsatilidad elevada permanente de GnRH y por consecuencia, una mayor secreción de LH sobre FSH. Esta desregulación neuroendocrina ocasiona, a nivel ovárico, una producción excesiva de andrógenos y menor desarrollo folicular [7] (Anexo N°2). Con respecto al hipotálamo y la hipófisis, estos son menos sensibles a los efectos supresores de las hormonas esteroideas

(progesterona y estrógeno), así manteniendo un nivel elevado de LH y por consiguiente manteniendo el estado hiperandrogénico (exceso de andrógenos) [8, 9].

Hasta el momento, se desconoce la causa principal del síndrome, pero se ha propuesto ser una condición multifacética en donde ocurre una interacción entre factores ambientales, metabólicos y genéticos/epigenéticos [10]. Asimismo, varios estudios sugieren que el hiperandrogenismo, la obesidad central y la resistencia a la insulina (RI) metabólicas a largo plazo como la diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2), dislipidemia, enfermedades cardiovasculares y complicaciones reproductivas son recurrentes en pacientes con SOP [13].

Aunque no haya un medicamento indicado sino terapias farmacológicas para tratar diferentes aspectos del SOP, se ha visto que muchos de ellos producen efectos secundarios en las pacientes [2]. El tratamiento más común es mediante la administración de pastillas anticonceptivas orales combinadas (AOC), que contienen estrógeno y progestina, inhiben el pico de LH, disminuye la sensibilidad del ovario hacia el FSH y, por lo tanto, disminuye la producción de estradiol provocando que se detenga la inducción de la ovulación [14]. Entre los efectos secundarios más asociados son cambios en el estado emocional [15], aumento de peso, náuseas, variaciones en el flujo menstrual, disminución del deseo sexual [16], tromboembolismo venoso [17], aumento en las tasas de cáncer de mama y de cuello uterino [18]. La elección de un tratamiento debe estar orientado a los síntomas de cada paciente y adaptado a los resultados que se quieren obtener. Aunque las estrategias terapéuticas para el SOP son aún limitados, estos deben estar dirigidos al tratamiento del hiperandrogenismo, disfunción ovárica y/o las asociaciones metabólicas. Aparte del uso de AOC, existen fármacos como los agentes sintetizadores de insulina (metformina), inhibidores de aromatasa (letrozol), entre otros [2].

En la actualidad, varios estudios se han enfocado en las propiedades terapéuticas de productos naturales sobre las características morfológicas del ovario poliquístico. En estudios en modelos de rata Wistar inducidas a ovario poliquística, se observaron

mejoras en las características de la morfología quística ovárica, por ejemplo, reducción en quistes foliculares y folículos atrésicos, aumento de cuerpos lúteo y reducción del espesor de la capa de teca después del tratamiento con productos naturales como la cúrcuma, té verde y soja [19, 20, 21]. Además, se reportó una restauración en el peso corporal y peso de los ovarios de las ratas que recibieron algún tratamiento con productos naturales. Los autores postulan que estas propiedades se pueden atribuir a la actividad antiinflamatoria y anti oxidativa.

Lepidium meyenii Walp. (Maca) es una especie vegetal alto andina que pertenece a la familia Brassicaceae y crece por encima de los 4000 metros de altitud [22]. Además de ser un alimento nutritivo, la raíz de maca contiene compuestos bioactivos como son los glucosinolatos, alcaloides, polifenoles, taninos, saponinas, macamidas y macaenos con propiedades que proveen beneficios a la salud [22, 23].

Entre sus principales efectos medicinales, se encuentra la mejora de la fertilidad, los efectos neuroprotectores, antidepresivos, antioxidantes, anticancerígenos y anti osteoporóticos [23, 24]. En adición, la maca también presenta propiedades antiinflamatorias. En una población consumidora de mezcla de ecotipos de maca en altitudes elevadas, los niveles séricos de IL-6 se vieron reducidos [25]. También, la maca ha exhibido efectos hepatoprotectores en un modelo de hepatitis aguda por medio de la inhibición de la inflamación y mecanismos adyacentes [26]. En ensayos con animales, las propiedades de la maca también se observan a través del aumento de la tasa de embarazo, protección contra la pérdida de masa y densidad ósea, balance de hormonas, alivio de síntomas menopáusicos y una mejora del orgasmo [27].

La maca ha sido clasificada en diferentes ecotipos según el color de la raíz [23]. Entre los más estudiados se encuentran la maca amarilla, roja y negra. La maca amarilla aumenta la energía, mejora la concentración y equilibra las hormonas [23]. La maca negra es más eficaz para los hombres, teniendo un efecto beneficioso en la ganancia muscular, recuento de espermatozoides y movilidad espermática en el epidídimo [23]. Mientras que la maca roja es el más efectivo para las mujeres debido a sus efectos en el equilibrio hormonal [23]. Por ejemplo, en un modelo de estudio en ratas hembras

ovariectomizadas, la maca roja presentó efectos similares a los del estradiol sobre la osteoporosis [22].

La maca roja también ha presentado propiedades antiinflamatorias y anti oxidativas. Su actividad antiinflamatoria ha sido evaluada en modelos de rata inducidas a hiperplasia prostática benigna (HPB) [28, 29, 30]. Se observó que la administración oral de extracto hidroalcohólico de maca roja (MR) tuvo participación en los procesos inflamatorios de la enfermedad actuando sobre los niveles de factores pro inflamatorios. En ratas hembras de la cepa Holtzman ovariectomizadas (OVX), el tratamiento con tres diferentes dosis de extracto hidroalcohólico de maca roja causó una reducción en los niveles de IFN- γ en una manera dosis dependiente resaltando su actividad antiinflamatoria [31].

Actualmente, las propiedades biológicas de *Lepidium meyenii* sobre los aspectos del síndrome de ovario poliquístico son escasas, sin embargo, se ha observado, en un estudio preliminar, que la administración de maca roja a ratas de la cepa Holtzman inducidas a SOP produce cambios, aunque no notorios, en los órganos reproductivos y la estructura del tejido ovárico. Los autores resaltaron que dicho resultado pudo ser debido a que solo se le administró este producto durante una semana [datos no publicados – Laboratorio de Endocrinología y Reproducción – UPCH, Anexo N°3, Anexo N°4, Anexo N°5, Anexo N°6, Anexo N°7, Anexo N°8).

Considerando que los tratamientos con AOC manifiestan efectos secundarios poco placenteros para las pacientes con SOP, es necesario evidenciar en un modelo de rata con presencia de ovario poliquístico, el efecto de la maca roja sobre el tejido ovárico y órganos reproductivos.

En este estudio, se utilizó el fármaco “Despamen®” compuesto por valerato de estradiol (VE) y enantato de testosterona (ET) para inducir e imitar las condiciones del síndrome de ovario poliquístico en modelos animales. De acuerdo al estudio piloto realizado por el laboratorio de Endocrinología y Reproducción, el uso de ratas de la cepa Holtzman demostró resultados de inducción de ovario poliquístico similares a la patología (Anexo

Anexo N°4, Anexo N°5, Anexo N°6, Anexo N°7, Anexo N°8). En adición, la cepa Wistar son de aquellas que se producen en mayor proporción en el bioterio central de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Teniendo en cuenta recientes estudios, las ratas expuestas a VE exhibieron aciclicidad, anovulación, folículos quísticos con una capa delgada de células de la granulosa y capa gruesa de células de la teca similar a los quistes ováricos observados en mujeres con SOP, tras una inyección única de 2 mg VE [32]. Amini et al. también pudieron observar la presencia de una disminución de los folículos preovulatorios y cuerpos lúteos mientras que los folículos atrésicos permanecieron en mayor cantidad en comparación al grupo control en ratones adultos inducidos con una dosis única de 4 mg/kg VE [33, 19]. En adición, Alivandi et al. observaron una disminución de folículos secundarios grandes y cuerpos lúteo, aumento de quistes, folículos atrésicos y presencia de teca hiperplásica tras una dosis única de 4mg/kg de VE [21].

Este trabajo permitirá evaluar las propiedades biológicas del extracto hidroalcohólico de maca roja (*Lepidium meyenii*) en modelos animales con SOP. Además, permitirá en un futuro posible, investigaciones clínicas en sujetos humanos con síndrome de ovario poliquístico.

II. HIPÓTESIS

El extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja mejora la estructura del tejido ovárico en un modelo de rata de la cepa Wistar inducidas a síndrome de ovario poliquístico con valerato de estradiol/enantato de testosterona.

III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿En un modelo de rata de la cepa Wistar inducidas a Síndrome de Ovario Poliquístico con valerato de estradiol/enantato de testosterona, el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja mejorará la estructura del tejido ovárico?

IV. OBJETIVOS

i. General

Determinar el efecto del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja sobre la histología del tejido ovárico, en ratas hembra de la cepa Wistar inducidas a síndrome de ovario poliquístico con valerato de estradiol/enantato de testosterona.

ii. Específicos

- Evaluar los cambios en el ciclo estral mediante patrones de citología vaginal del grupo control e inducido a SOP.
- Determinar la presencia de SOP en ratas inducidas con valerato de estradiol/enantato de testosterona mediante la evaluación histológica del ovario.
- Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos sobre la histología de la estructura ovárica, recuento de folículos, peso corporal y peso del ovario de la rata comparado con el grupo control.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

i. Animales de experimentación

Se obtuvieron un total de 30 ratas hembra de 3 meses de edad de la cepa Wistar del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Lima, Perú). Las ratas se dejaron 7 días para que se adecuen a las jaulas y al nuevo ambiente. Fueron seleccionadas de forma aleatoria y mantenidas en un número de 6 animales por jaula en un ambiente bajo condiciones estándares de laboratorio a 22°C y con ciclos alternados de 12 horas luz/oscuridad. Fueron alimentadas con alimento para roedores y agua *ad libitum*. La limpieza de la jaula y el cambio de material del lecho se realizó dos a tres veces por semana. Asimismo, los bebederos fueron lavados y desinfectados cada vez que se administró agua. Los desechos biológicos fueron puestos en bolsas rojas que luego fueron descartadas en la zona de desechos biológicos y contaminados en el área posterior

del LID. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo a la “Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio” (Instituto Nacional de Salud, 2010) [34].

ii. Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica fue basada según el Sistema de Clasificación Filogenético de Adolph Engler publicado en la XII edición del Syllabus Der Pflanzenfamilien del año 1954-1964 [55], tal y como sigue:

DIVISIÓN: Angiospermae

CLASE: Dicotyledoneae

SUBCLASE: Archichlamydeae

ORDEN: Papaverales

FAMILIA: Brassicaceae

GENERO: *Lepidium*

ESPECIE: *Lepidium meyenii*

NOMBRE VERNACULAR: “Maca”, “maca”, “Ayak willku”

iii. Preparación del extracto hidroalcohólico de maca roja

Para la preparación de extracto hidroalcohólico se utilizan los hipocótilos secos de maca roja para preparar los extractos. La Maca Roja seca molida (1Kg) fue macerada en 2L de etanol al 70% durante 72 h con constante agitación. Luego, el líquido fue filtrado y el sobrenadante fue sometido a un proceso de secado por atomización [35].

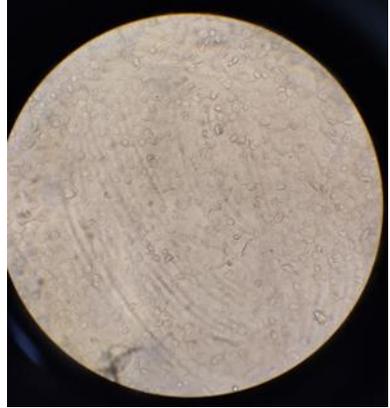
Para este estudio, se utilizó el producto en sobres con un rendimiento de 3 gramos de extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja adquiridos de la empresa Cayenatur E.I.R.L. (Marca Juvens). Se realizaron las respectivas disoluciones con agua destilada para obtener diferentes dosis las cuales fueron administradas a los animales de experimentación. El producto se diluyó con agua destilada para obtener diferentes concentraciones en 1 ml. Las dosis administradas a los animales fueron 0.17 mg/kg y 0.32 mg/kg por peso corporal.

iv. Frotis Vaginal

Para determinar el ciclo ovárico de las ratas, se evaluó la citología vaginal por medio de frotis vaginales para la determinación de las fases del ciclo estral. Se realizó diariamente a lo largo del experimento entre las 16:00 hrs. y 18:00 hrs.

Para la recolección de la muestra mediante frotis húmedo, se utilizó una pipeta estéril de 100 uL y agua estéril o salina. Con una mano se sujetó a la rata y con la otra se introdujo la punta de la pipeta en la vagina de la rata a una profundidad de 5 – 10 mm. Es importante no sobrepasar el límite de profundidad para no inducir un pseudoembarazo. Se enjuagó la vagina mediante expulsión y aspiración entre 2 a 3 veces con la solución salina o agua estéril. La muestra húmeda recogida con la pipeta se extendió en una lámina portaobjetos y se observó al microscopio [56, 57].

El ciclo estral tiene una duración entre 4 – 5 días. Está compuesto por cuatro fases y su clasificación depende de la presencia, ausencia y cantidad de diferentes tipos celulares (Tabla N° 1) [57].

Fase del Ciclo Estral	Características	Imagen
Proestro	Corresponde a la fase pre ovulatoria. Predominan las células epiteliales nucleadas, de tamaño uniforme, organizadas de forma aislada o formando grupos.	

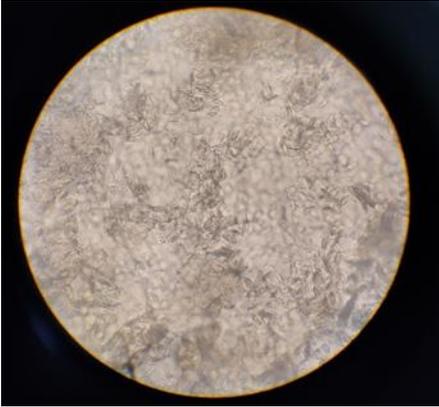
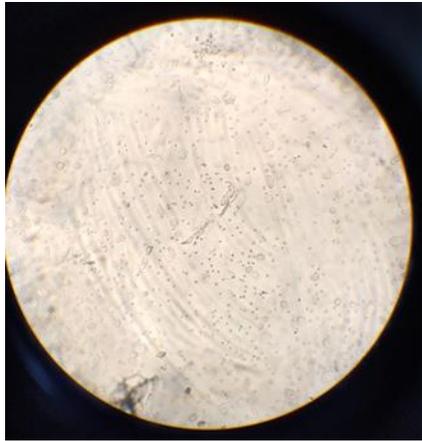
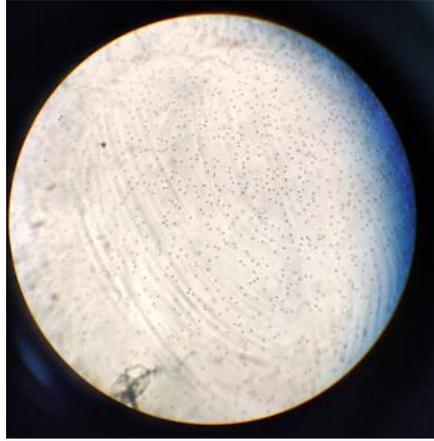
<p>Estro</p>	<p>Presencia de la ovulación. Predominan las células epiteliales cornificadas anucleadas de forma irregular, organizadas en grupo.</p>	
<p>Metaestro</p>	<p>Aparece en ausencia de gestación. Presencia de un conjunto de células epiteliales cornificadas y leucocitos.</p>	
<p>Diestro</p>	<p>Predominancia de leucocitos y algunas células cornificadas.</p>	

Tabla N° 1: Descripción de las fases del ciclo estral de la rata. Fuente: Elaboración propia

v. Diseño de investigación

Para la inducción de SOP, las ratas recibieron una inyección intramuscular (i.m) de Valerato de estradiol + Enantato de Testosterona (VE/ET) (5.0mg/kg y 100mg/kg) (Despamen[®])

En primer lugar, se analizó la citología vaginal mediante frotis vaginal para registrar el ciclo ovárico de las ratas. Aquellas ratas que presentaron ciclos estrales regulares fueron consideradas para el estudio. Ciclos estrales irregulares y la presencia de una fase de metaestro-diestro prolongado, en los grupos que se les administró VE/ET, se consideró como signo de inducción de SOP, postulado en otra investigación [36]. Se administró el extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja durante 4 semanas y se realizó en el horario de 8:00 hrs. y 10:00 hrs. A lo largo del estudio, también se evaluó el peso corporal de cada rata antes de iniciar y después de concluir cada tratamiento.

El estudio experimental comparó grupo control, grupo SOP y grupos que recibieron tratamientos. Se incluyeron cinco grupos de experimentación, de seis animales cada uno ($n = 30$). A continuación, se describen los grupos experimentales y el orden cronológico de la investigación (Figura N°1):

Grupo I (Control): El grupo control fue sometido al mismo estrés que los grupos tratados, por eso se les administró vía oral agua como vehículo del extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja vía oral y vía intramuscular (i.m) aceite de oliva. El aceite de oliva se utilizó como vehículo de la inyección intramuscular del valerato de estradiol/Enantato de Testosterona.

Grupo II (VE/ET): recibió una inyección intramuscular (i.m) de una dosis única de 0.1 ml de valerato de estradiol + Enantato de Testosterona (VE/ET) (5.0mg/kg y 100mg/kg) (Despamen[®])

Grupo III (Control Positivo): recibió una inyección intramuscular (i.m) de una dosis única de 0.1 ml de valerato de estradiol + Enantato de Testosterona (VE/ET) (5.0mg/kg

y100mg/kg) (Despamen[®]) más pastillas anticonceptivas (30 ug drospirenona/día + 0.125 ug etinilestradiol/día) diarias por 4 semanas en función al peso de la rata (Yazmin[®], BAYER) vía oral.

Grupo IV (VE/ET + MR40): recibió una inyección intramuscular (i.m) de una dosis única de 0.1 ml de valerato de estradiol + Enantato de Testosterona (VE/ET) (5.0 mg/kg y100 mg/kg) (Despamen[®]) más extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja (MR) vía oral en una dosis diaria de 0.17 mg/kg en forma simultánea.

Grupo V (VE/ET + MR80): recibió una inyección intramuscular (i.m) de una dosis única de 0.1 ml de valerato de estradiol + Enantato de Testosterona (VE/ET) (5.0 mg/kg y 100 mg/kg) (Despamen[®]) más extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja (MR) vía oral en una dosis diaria de 0.32 mg/kg de forma simultánea (Tabla N° 2).

GRUPOS	TRATAMIENTO	N (MUESTRAL)
GRUPO I (Control)	Agua (vehículo) + aceite de oliva	6
GRUPO II	VE/ET i.m	6
GRUPO III	VE/ET i.m + Yazmin	6
GRUPO IV	VE/ET + Maca Roja (0.17 mg/ml)	6
GRUPO V	VE/ET + Maca Roja (0.32 mg/ml)	6

Tabla N°2: Grupos de tratamiento
Fuente: Elaboración propia



Figura N°1: Orden cronológico del estudio.
Fuente: Elaboración propia

ACTIVIDAD	Semana	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28 - 50	51	52	53			
Pesado y separación de animales por grupo		x																																		
Frotis vaginal diario		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x																						
Inducción del SOP							x	x	x																											
Tratamientos											x	x	x	x																						
Pesado de animales																x																				
Sedación																x																				
Extracción de sangre																x																				
Recolección de órganos reproductivos (ovario y útero) y pesado																x																				
Procesamiento de muestras de sangre																x																				
Procesamiento de muestras de ovario.																	x	x																		
Evaluación Histológica del ovario																			x	x																
Recolección de datos																					x															
Análisis estadísticos																						x	x	x	x											
Interpretación y redacción de resultados																										x	x	x	x							
Redacción de discusión																																	x			
Correcciones																																		x	x	x

Tabla N° 3: Diagrama de Gantt sobre el Cronograma del Trabajo

vi. Tamaño de muestra

Considerando un estudio anterior [19], se tuvo en cuenta los valores de 0.01 para la desviación estándar y el conteo inicial y final de CL en ratas con síndrome de ovario poliquístico inducidas por VE/ET que recibieron algún tratamiento con plantas medicinales.

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_0)^2}$$

Donde:

- σ = Desviación estándar
- Z_{α} = 1,96 (nivel de confianza del 95%)
- Z_{β} = 0,84 (poder estadístico 80%)
- μ = media de CL inicial
- μ_0 = media de CL posterior al tratamiento

Se obtuvo el valor de 5 ratas por grupo. Considerando el 15% de proporción esperada de pérdidas se obtiene una n de 6 animales, asumiendo que ese es el mínimo número de ratas.

vii. Evaluación histológica del ovario y conteo folicular

Todos los ovarios fueron pesados antes de cada procedimiento. Para la evaluación histológica se extrajo el ovario derecho de cada rata los cuales se fijaron en formaldehído tamponado al 4% por al menos 24 hrs. La muestra fijada se sometió a una inclusión y bloque en parafina y se realizaron cortes longitudinales y en serie en secciones de 5 μ m de espesor. Los cortes histológicos, teñidos previamente con hematoxilina y eosina [21] se observaron usando un microscopio óptico (Leica DM1000) a una magnitud de 10X para la identificación de los folículos. El conteo y clasificación de los folículos se realizó de acuerdo a los siguientes criterios: (1) Folículos primordiales con una sola capa de

células de la granulosa aplanadas; (2) Folículos primarios con una sola capa de células de la granulosa cuboideas; (3) Antrales si tienen un solo espacio antral grande; (4) Folículos atrésicos cuando presentan alguna deformación, ovocito ausente o presencia de núcleos picnóticos en las células de la granulosa;(5) Cuerpos lúteo es un folículo maduro que se ha desarrollado luego de la ovulación y (6) Quistes ováricos son sacos membranosos o cavidades de carácter anormal que contienen líquido (Figura N°1) [33, 53].

Para observar todo el ovario, se observó a una magnitud de 40X, donde pudimos diferenciar las estructuras ováricas como los quistes y cuerpos lúteos. El conteo de folículos saludables primordiales y primarios se observaron a una magnitud de 400X para distinguir detalladamente las células de la granulosa que rodean al ovocito. Finalmente, los folículos antrales, preovulatorios y folículos atrésicos se observaron a una magnitud de 40X y 100X. El conteo de los folículos se realizó dentro de 9 secciones representativas separadas por al menos 20 um a una magnitud de 100X [33].

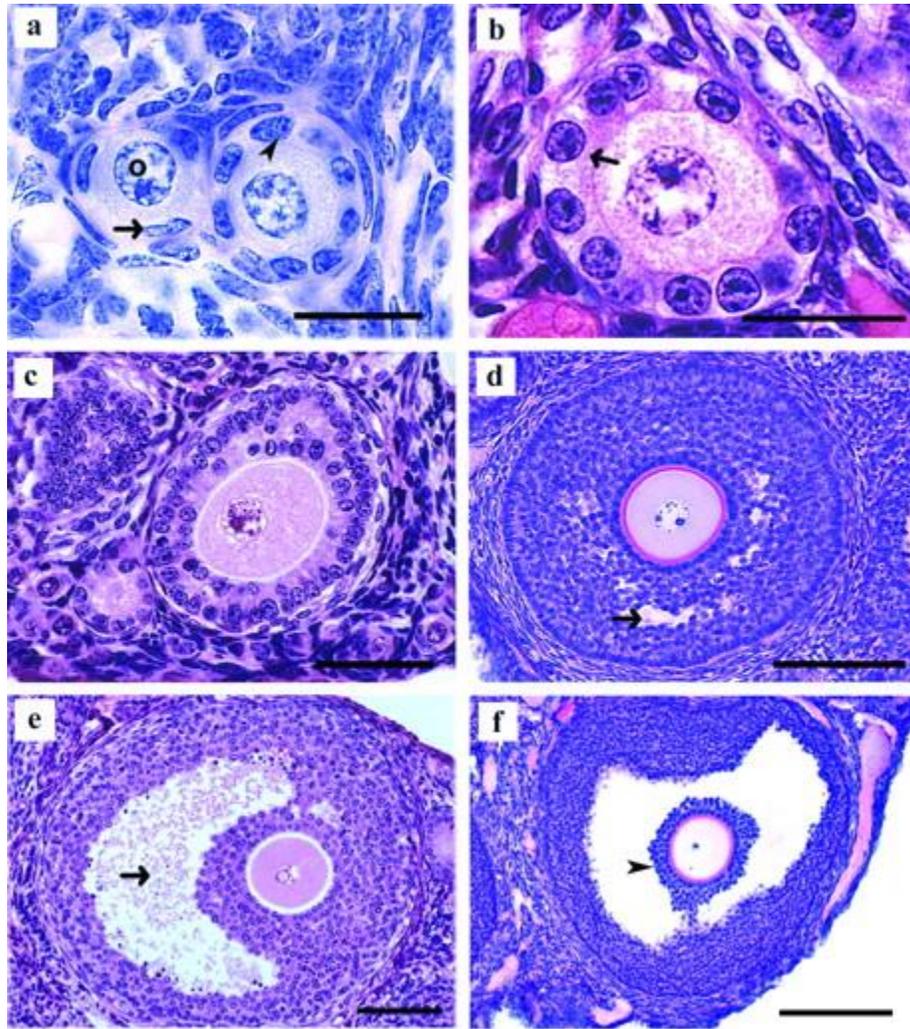


Figura N°2: Clasificación folicular. a) Folículo primordial b) Folículo primario c) Folículo secundario d) Folículo preantral e) Folículo antral f) Folículo preovulatorio. Fuente: Myers M, Britt KL, Wreford NGM, Ebling FJP, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *J Reprod Fertil.* 2004;127(5):569–80. Disponible en: <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/127/5/1270569.xml>

viii. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de la experimentación fueron ingresados a una base de Excel y posteriormente se evaluaron en el programa estadístico STATA v.17. En primer lugar, se evaluó la distribución normal de los datos mediante el Test de normalidad Shapiro-Swilk y un histograma para observar la distribución de los datos. Se realizó un test de ANOVA de una vía teniendo como factores los diferentes tratamientos (Control, VE, VE+YAZMIN, VE+MR40 y VE+MR80) y las variables dependientes (Número de folículos primordiales, folículos primarios, folículos antrales, quistes, cuerpos lúteos y peso corporal, peso del útero y de ovario). Para comparar los diferentes tratamientos sobre las variables dependientes, se realizaron gráficos de barras incluyendo la significancia estadística. De encontrarse efectos significativos en el ANOVA, se realizaron pruebas post-hoc de Tukey. En caso contrario, cuando los datos no presentaron normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar la diferencia para más de dos grupos. Se presentaron los resultados como media y desviación estándar. Para todos los análisis estadísticos, se consideró una significancia de $p=0.05$.

ix. Descripción de las variables

Se evaluaron las variables cuantitativas y cualitativas para abordar los objetivos del estudio tal como se señala en la Tabla N°4.

Variable	Definición		Criterios de medición	Tipos de variable
	Conceptual	Operacional		
Número de Folículos primordiales	Folículos primordiales con una sola capa de células aplanadas de la granulosa.	Número de folículos primordiales en 9 secciones histológicas representativas por ovario.	Discreta Escala: De razón	Dependiente Cuantitativa
Número de Folículos primarios	Folículos primarios con una sola capa de células cuboideas de la granulosa	Número de folículos primarios en 9 secciones histológicas representativas por ovario.	Discreta Escala: De razón	Dependiente Cuantitativa
Número de Folículos secundarios	Folículos secundarios con dos o más capas de células de la granulosa cuboideas.	Número de folículos secundarios en 9 secciones histológicas representativas por ovario.	Discreta Escala: De razón	Dependiente Cuantitativa
Número de Folículos antrales	Antrales si tienen un solo espacio antral grande	Número de folículos antrales en 9 secciones histológicas	Discreta Escala: De razón	Dependiente Cuantitativa

		representativas por ovario.		
Número de Quistes ováricos	Sacos membranosos o cavidades de carácter anormal que contienen líquido	Número de quistes ováricos en 9 secciones representativas histológicas por ovario.	Discreta Escala: De razón	Dependiente Cuantitativa
Número de Cuerpos lúteo	Cuerpo lúteo, cuerpo secretor de hormonas amarillas en el sistema reproductivo femenino. Se forma en un ovario en el sitio de un folículo, o saco, que ha madurado y liberado su óvulo en el proceso conocido como ovulación.	Número de cuerpos lúteos en 9 secciones representativas histológicas por ovario	Discreta Escala: De razón	Dependiente Cuantitativa

Peso del animal	Fuerza con que la tierra atrae un cuerpo.	Peso en gramos registrado con una balanza de precisión.	Continua Escala: De razón	Dependiente Cuantitativa
Peso del ovario	Fuerza con que la tierra atrae un cuerpo	Peso en gramos registrado con una balanza de precisión.	Continua Escala: De razón.	Dependiente Cuantitativa
Ciclo estral	En ratas y ratones, es un proceso fisiológico y repetitivo donde suceden cambios en los niveles de hormonas a lo largo del ciclo.	Presencia de 4 tipos de células en el epitelio vaginal: Células cornificadas no nucleadas, leucocitos, células nucleadas.	Ordinal	Dependiente Cualitativa

Tabla N°4: Descripción de las variables

x. Consideraciones éticas

Los procedimientos utilizados para el tratamiento de los animales durante el tiempo que se realizó la experimentación contaron con la aprobación del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales – CIEA de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (Código SIDISI: 207709). El cuidado de los animales se llevó a cabo de acuerdo a la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (Instituto Nacional de Salud, 2010).

Para garantizar el bienestar de los animales se realizó la limpieza rutinaria de las jaulas y el cambio de material del lecho dos a tres veces por semana. Asimismo, se dispuso de alimento diario y los bebederos fueron lavados y desinfectados. Asimismo, los animales fueron atendidos y observados por personal calificado todos los días para reconocer signos de enfermedades y/o conductas anormales en caso se presentarían.

El alivio del dolor asociado a los procedimientos quirúrgicos a los cuales se sometieron los animales de experimentación fue mediante la selección y aplicación del anestésico adecuado para la especie. La eutanasia fue necesaria al final de la recolección de muestras como medio para eliminar el dolor y estrés inducido al animal, que fue realizado por el personal capacitado. Los desechos biológicos fueron removidos y eliminados de forma regular y segura en botes de basura identificados dentro del bioterio.

VI. RESULTADOS

i. Ciclo estral

El registro del ciclo estral se analizó durante todo el experimento. En el grupo control, las ratas presentaron ciclos regulares de 4-5 días. Sin embargo, en los grupos donde se administró enantato de Testosterona/Valerato de estradiol para inducir el ovario poliquístico, los animales presentaron ciclos estrales alterados permaneciendo en fase de diestro, similar a otros estudios (Figura N°3 y 4) [36].

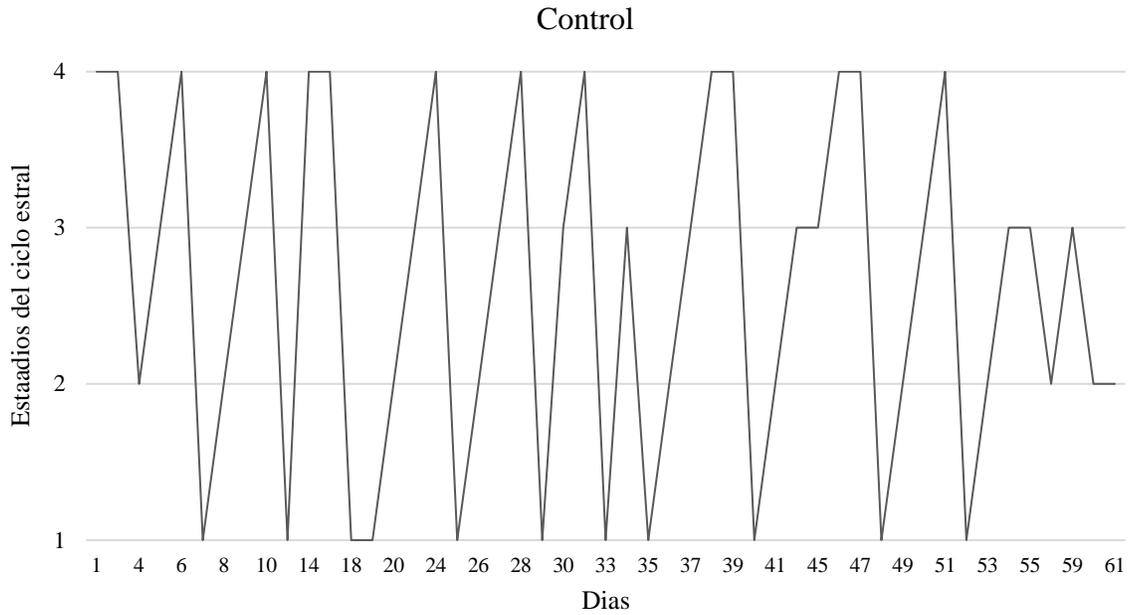


Figura N°3: Ciclo estral normal del grupo control. 1, proestro; 2, estro; 3, metaestro; 4, diestro.

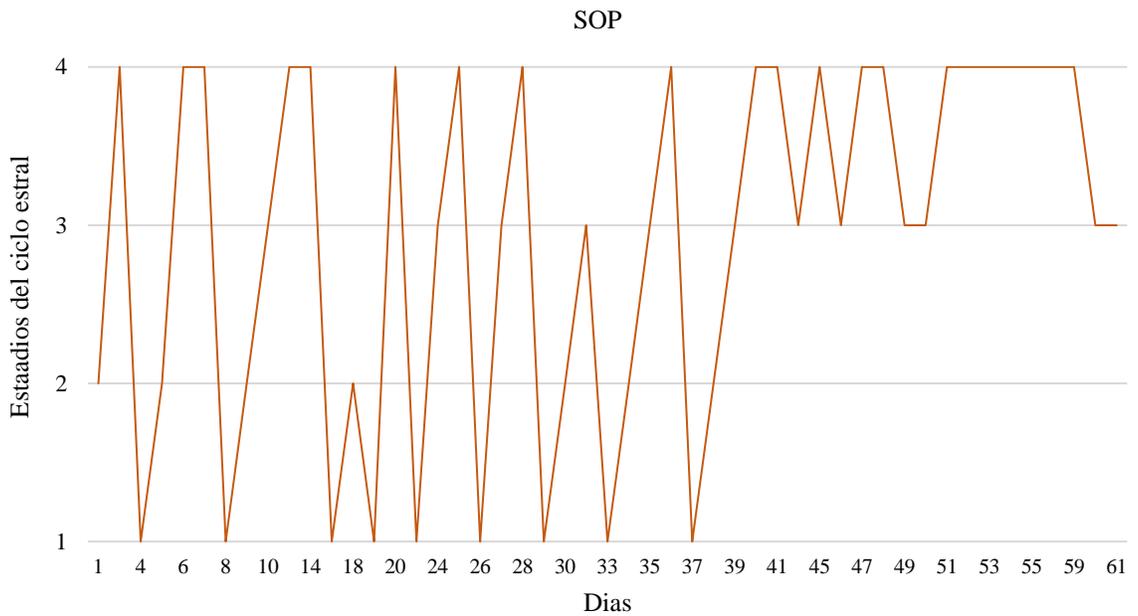


Figura N°4: Fase de metaestro y diestro prolongado luego de la inducción de SOP en el día 39. 1, proestro; 2, estro; 3, metaestro; 4, diestro.

ii. Peso de los animales

El peso corporal de todos los grupos experimentales no varió significativamente al inicio y al final del estudio. Podemos notar que las ratas del grupo control tuvieron el mayor aumento de peso en comparación a los otros grupos. Todos los grupos experimentales estuvieron en las mismas condiciones ambientales y recibieron alimentación equitativa. Sin embargo, podemos notar que los animales que recibieron tratamiento con maca roja disminuyeron en peso corporal, siendo la mayor pérdida aquellas que recibieron dosis de 80 mg/kg de maca roja, y en segundo lugar las ratas con ovario poliquístico que no recibieron tratamiento (Tabla N°5, Figura N°5).

	Peso Inicial	Peso Final	Delta
	M ± SE	M ± SE	M± SE
CONTROL	234.33 ± 5.45	240.17 ± 5.46	+5.83 ± 3.71
SOP	240.50 ± 4.19	233.83 ± 2.98	-6.67 ± 2.75
SOP + YAZMIN	238.50 ± 3.42	239.67 ± 4.31	1.17 ± 1.28
SOP + MR40	241.50 ± 6.22	236.17 ± 6.11	-5.33 ± 2.26
SOP + MR80	249.83 ± 7.67	233.83 ± 2.98	-16.0 ± 8.16

Tabla N°5. Comparación entre el peso corporal inicial y final de los diferentes grupos experimentales y su delta de peso. Los valores están expresados como medias y error estándar.

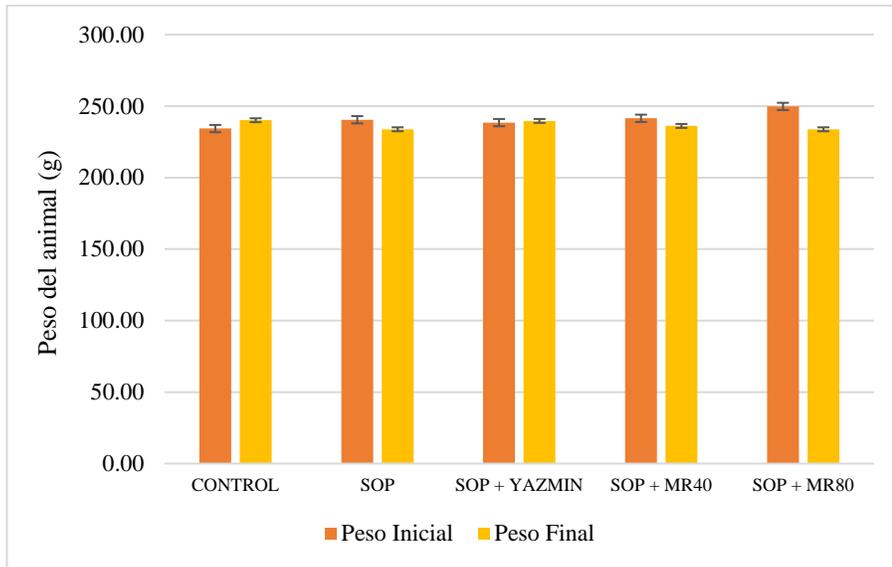


Figura N°5: Peso del animal (g) de los diferentes grupos experimentales. Los valores están expresados como medias y erros estándar.

iii. Peso del útero

En la Figura N° 6 se observa que el peso del útero ($p < 0.05$) fue significativamente mayor en los animales inducidos a SOP en comparación al grupo control. El peso del útero en los grupos con tratamiento con maca y Yazmin tuvieron menores valores comparado el grupo SOP, pero esta diferencia no fue significativa ($p > 0.05$).

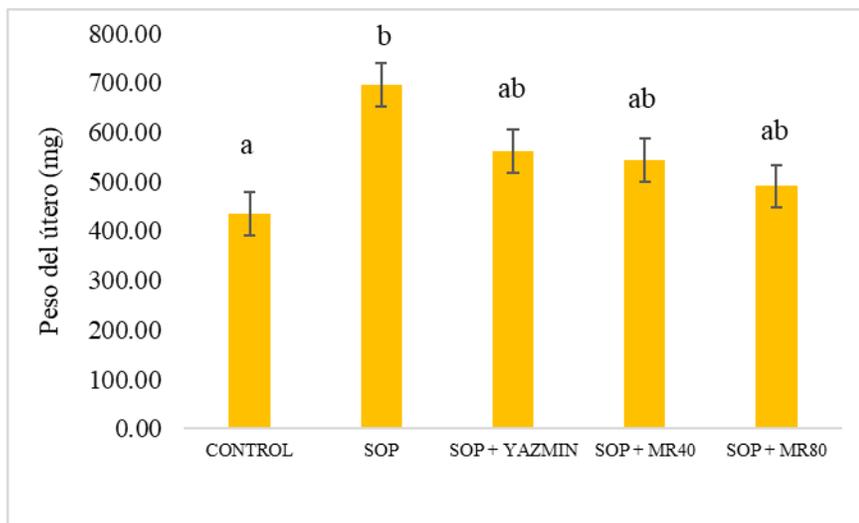


Figura N° 6: Peso del útero (mg) de los diferentes grupos experimentales al final del estudio. Los valores están expresados como medias y errores estándar.

iv. **Peso del ovario**

En la Figura N° 7 observamos que en los animales inducidos a SOP, la media del peso ovárico fue menor con respecto al grupo control. Asimismo, se observa una ligera disminución del peso del ovario cuando comparamos los grupos con tratamiento (Yazmin y Maca Roja) con el grupo SOP.

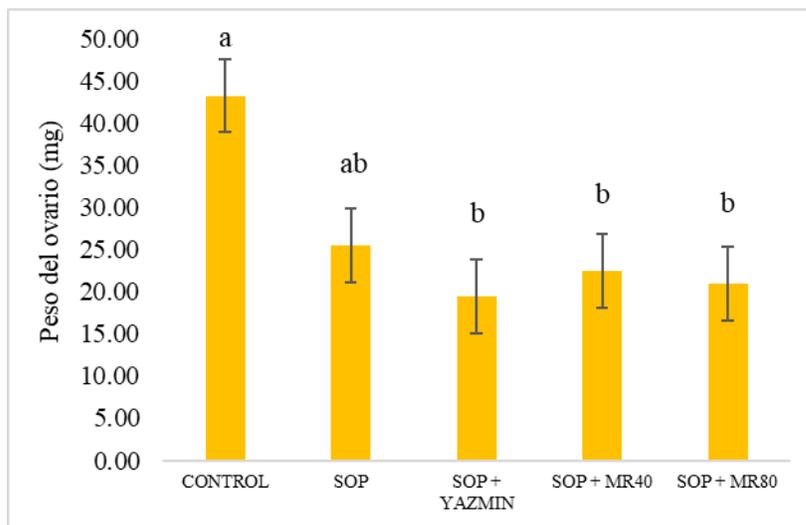


Figura N° 7: Peso del ovario (mg) de los diferentes grupos experimentales al final del estudio. Los valores están expresados como medias y errores estándar.

v. **Morfología ovárica**

El conteo de folículos en cortes histológicos ováricos de todos los grupos experimentales se evaluó al finalizar la 4ta semana de tratamiento.

Los animales inducidos a ovario poliquístico (VE+TE) mostraron una morfología ovárica característica (Figura N°14, B). Se observó una disminución significativa de cuerpos lúteos a comparación del grupo control (Figura N°8). En los grupos que recibieron algún tratamiento, no mostraron cambios en el número de cuerpos lúteo, sin embargo, el grupo que recibió una dosis mayor de maca roja (SOP+MR80), el número de cuerpos lúteo aumento significativamente, con una estructura ovárica histológica similar al grupo control (Figura N°14, A y E).

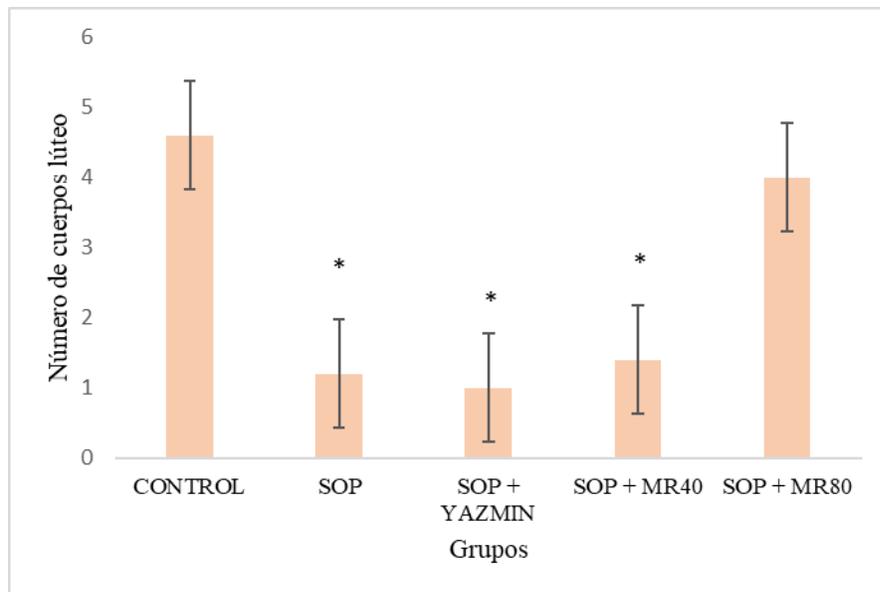


Figura N°8: Conteo de cuerpos lúteo en los diferentes grupos experimentales. Los valores están expresados como medias y sus errores estándar. *P < 0.05 respecto al grupo control.

En los animales inducidos a ovario poliquístico (VE+TE) se observó un aumento significativo de quistes ováricos comparado con el grupo control. El efecto inductor de SOP se observó en todas las ratas experimentales, representando un porcentaje del 100%. El número de quistes ováricos disminuyó significativamente luego de que las ratas recibieran tratamiento, sin embargo, en el grupo que se le administró una mayor dosis de maca roja

(80 mg/ml) se observó una estructura ovárica similar al del grupo control (Figura N°9 y Figura N°14, E).

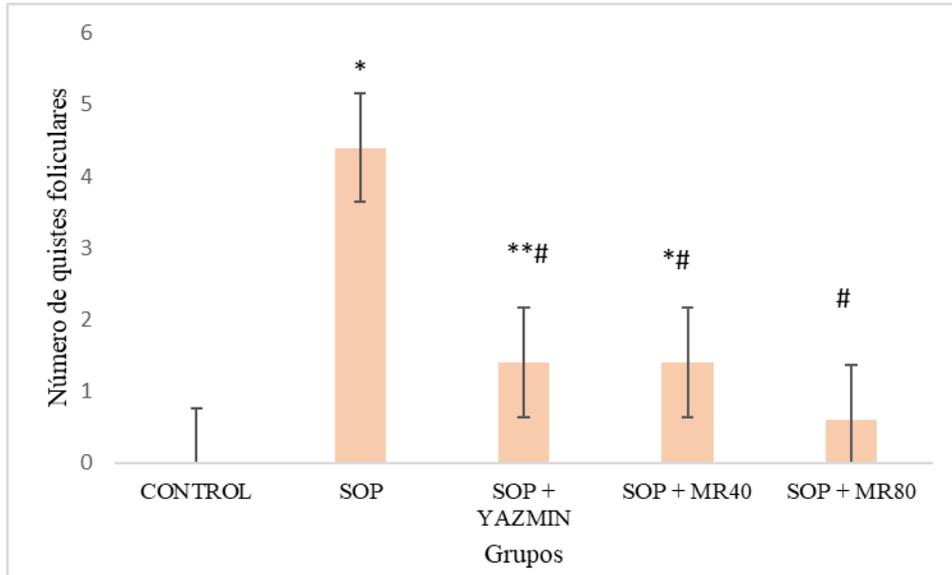


Figura N°9: Conteo de quistes foliculares en los diferentes grupos experimentales. Los valores están expresados como medias y sus errores estándar. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.005$ vs. Grupo control; # $P < 0.05$ vs grupo SOP.

Por otro lado, el número de folículos saludables (folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales) no presentaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura N°10, 11, 12 y 13).

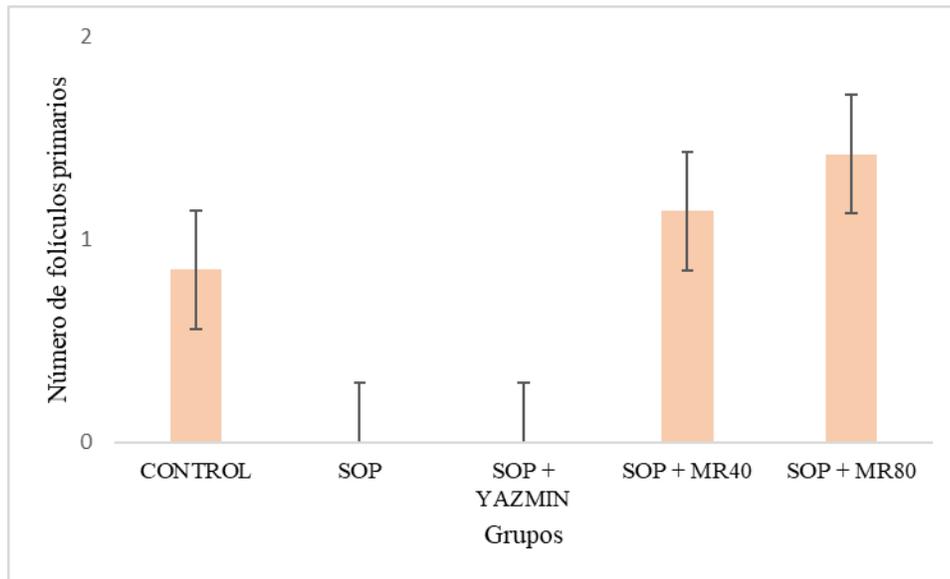


Figura N°10: Conteo de folículos primarios en los diferentes grupos experimentales. Los valores están expresados como medias y sus errores estándar.

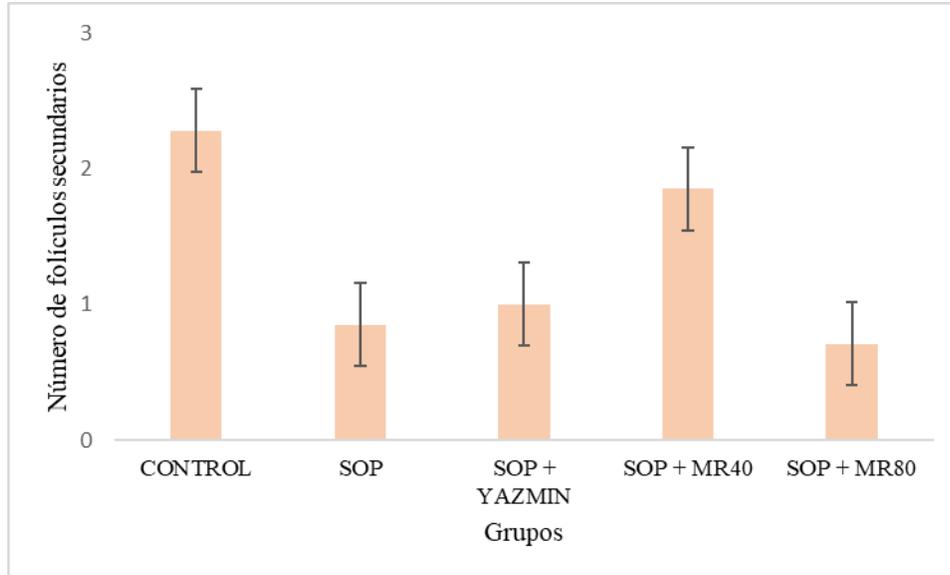


Figura N°11: Conteo de folículos secundarios en los diferentes grupos experimentales. Los valores están expresados como medias y sus errores estándar.

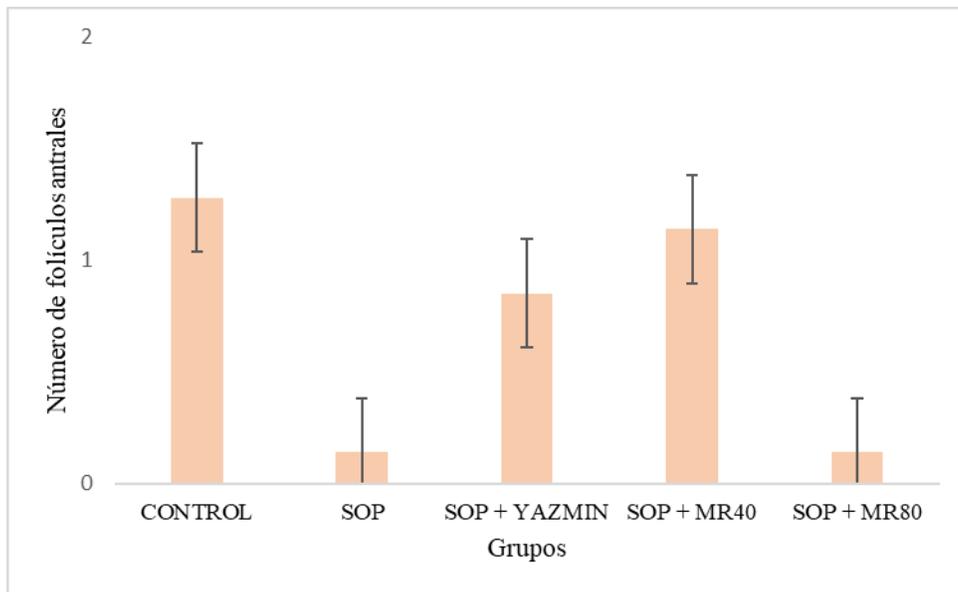


Figura N°12: Conteo de folículos antrales en los diferentes grupos experimentales. Los valores están expresados como medias y sus errores estándar.

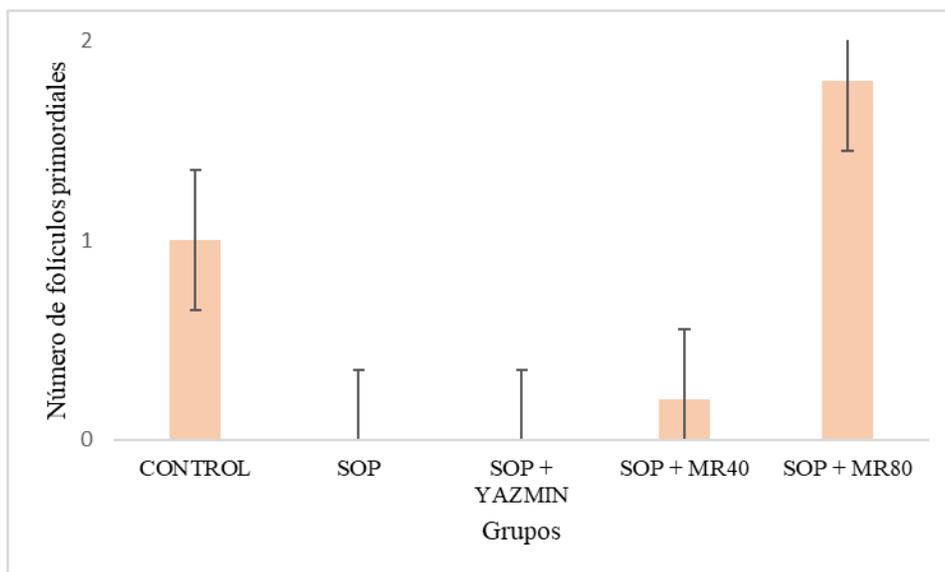
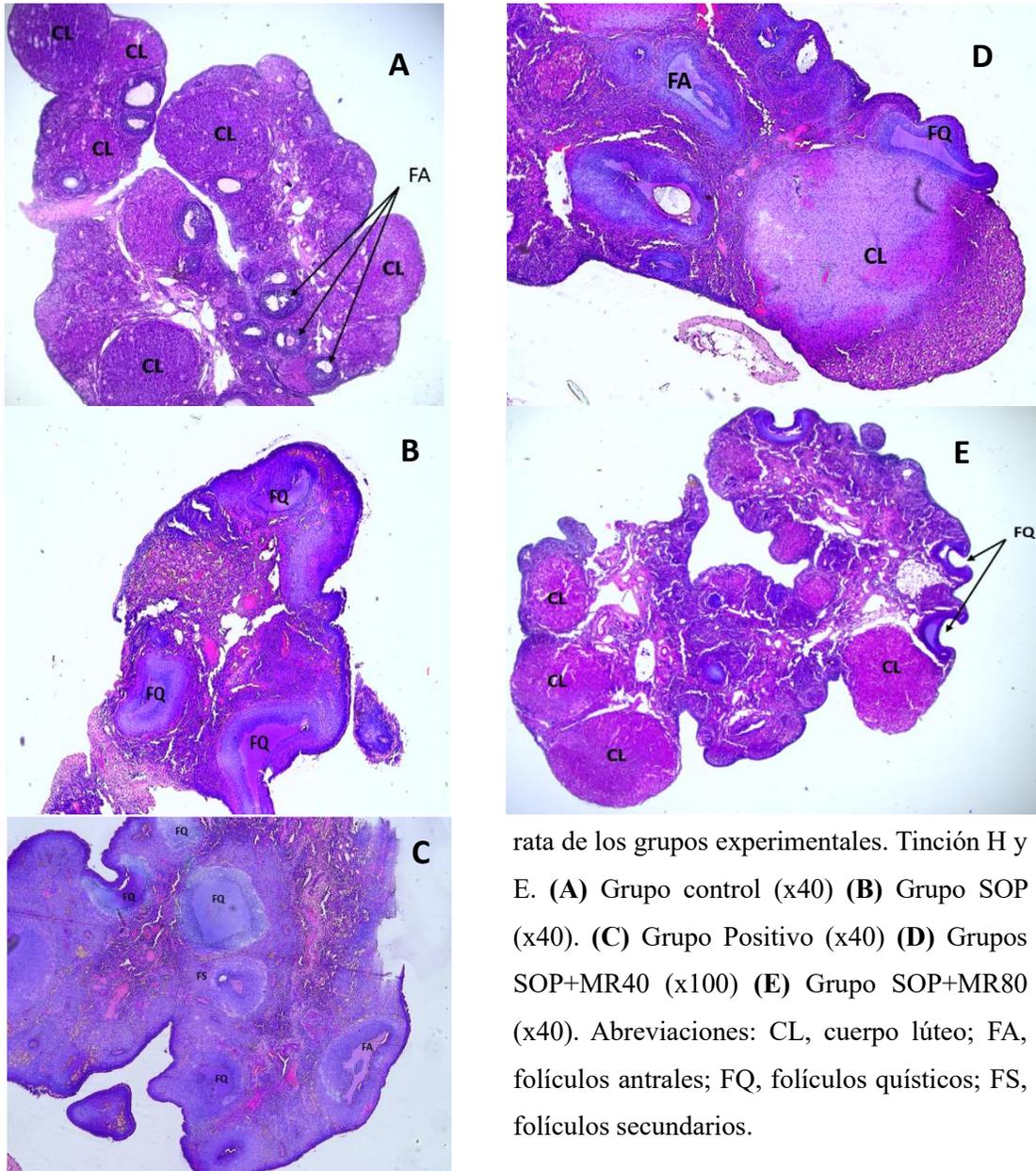


Figura N°13: Conteo de folículos primordiales en los diferentes grupos experimentales. Los valores están expresados como medias y sus errores estándar.



rata de los grupos experimentales. Tinción H y E. (A) Grupo control (x40) (B) Grupo SOP (x40). (C) Grupo Positivo (x40) (D) Grupos SOP+MR40 (x100) (E) Grupo SOP+MR80 (x40). Abreviaciones: CL, cuerpo lúteo; FA, folículos antrales; FQ, folículos quísticos; FS, folículos secundarios.

VII. DISCUSIÓN

El presente estudio analizó la estructura del tejido ovárico mediante cortes histológicos de ratas inducidas a ovario poliquístico con Valerato de estradiol/Enantato de testosterona (VE/ET) y sus tratamientos.

En este estudio, el tejido ovárico del grupo inducido a ovario poliquístico, presentó un aumento en el número de quistes ováricos y una disminución en el número de cuerpos lúteo a comparación de su grupo control. Además, en el grupo SOP se observó una tendencia a la pérdida de folículos primordiales, primarios, secundarios y antrales a comparación del grupo control, sin embargo, esta disminución no fue significativa. Estos resultados en el ovario de ratas expuestas a una sola dosis de VE y ET concuerdan con otras investigaciones en modelos murinos [33, 37 - 41].

Al examinar los cortes histológicos del ovario, nuestros resultados nos confirman la existencia de anovulación al no observarse cuerpos lúteos recién formados (Figura N°14, B).

Las variaciones que puedan presentarse en los ovarios, útero y vagina, reflejan el estado del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. A lo largo del estudio, se registró el ciclo estral de las ratas mediante citología vaginal el cual se usó como indicador de la función del ciclo reproductivo [56]. Observamos que el ciclo estral de las ratas del grupo SOP fueron detenidos, presentando una fase de diestro prolongado con una alta presencia de leucocitos. Caso contrario, las ratas del grupo control mantenían ciclos estrales normales con una duración de 4-5 días. Estos resultados fueron concordantes con otros estudios [32, 36, 41].

En base a estas observaciones, se podría decir que los animales que fueron inducidos a SOP exhibieron aciclicidad y anovulación, lo que estaría relacionado a la ausencia del pico de LH y a trastornos reproductivos endocrinos [42]. Entonces, la administración de Valerato de estradiol/Enantato de testosterona (VE/ET) produjo fallos en el desarrollo normal folicular en los ovarios de ratas adultas y desarrolló una morfología ovárica poliquística similar a la patología.

Después de recibir los diferentes tratamientos, el número de cuerpos lúteo (CL) en el grupo SOP+MR80 fueron significativamente mayores en comparación al grupo SOP, y observándose un número cercano de CL al del grupo control. Este resultado nos sugiere que la administración de maca roja tuvo un rol sobre la función ovárica mediante la formación de nuevos cuerpos lúteos (Figura N°14, E) sugiriéndonos que se ha reclutado

una mayor cantidad de folículos y restaurado la ovulación. En respuesta a esto, el número de quistes ováricos disminuyó luego del tratamiento con maca roja.

Es conocido también que la apariencia poliquística implica un conjunto de procesos endocrinos y metabólicos [43]. En este trabajo no se analizaron las hormonas femeninas (estrógeno y progesterona) y hormonas gonadotrópicas (LH y FSH) importantes en la regulación de la ovulación y el proceso del desarrollo folicular. Se recomienda observar el comportamiento de dichas hormonas en estudios posteriores.

Con respecto a los órganos reproductivos, los úteros de las ratas inducidas a SOP obtuvieron un mayor peso comparado al grupo control. *Mirabolghasemi et. al* observó en secciones histológicas de tejido uterino un aumento significativo del espesor de la pared del útero y la altura del epitelio luminal de ratas tratadas con VE en comparación a su grupo control. Estos cambios se le puede atribuir a alteraciones en la tasa de proliferación en el tejido endometrial del útero y por consiguiente desarrollar una respuesta temprana de hiperplasia uterina lo que aumenta el tamaño y peso de dicho órgano [44]. Adicional a esto, es posible que la descontrolada proliferación de células endometriales sea debido a un desbalance en las vías de señalización apoptóticas, según estudio [45]. También en un estudio en ratas ovariectomizadas, la administración de estrógeno exógeno incrementó el peso uterino [46].

El peso del ovario de las ratas inducidas a ovario poliquístico presento una tendencia a disminuir con respecto al grupo control, aunque el resultado no fue significativo. Brawer et al. observaron un decrecimiento en el peso de los ovarios luego de que las ratas hayan sido tratadas con VE [42]. Por otro lado, estudios contradictorios confirman un aumento en el peso del ovario [40].

Los resultados observados de este primer estudio demostraron la efectividad del extracto hidroalcohólico de maca roja sobre la restauración de la estructura del tejido ovárico en un modelo de ratas inducidas a ovario poliquístico con VE/ET. Se ha reportado, en estudios experimentales con animales, las propiedades medicinales de la maca (*Lepidium meyenii*) sobre la función reproductiva y hormonas involucradas en la fisiología reproductiva [22, 23, 47 - 49].

La composición nutricional de la maca contiene 10.2% de proteína, 59% carbohidratos hidrolizables, 2.2% de lípidos y 8.2% de fibra. Asimismo, la maca comprende un conjunto de metabolitos secundarios a los que se les atribuye su actividad biológica como son: glucosinolatos, alcaloides de imidazol, tiazoles, macahidantoínas y macatiohidantopina, meyeriinas, fitoesteroles, ácidos grasos, polifenoles, taninos, saponinas, flavonoides, entre otros [58, 59]. *Gonzales GF* encontró en extractos hidroalcohólicos atomizados de maca roja el mayor contenido de glucosinolatos [60]. La presencia de glucosinolatos y derivados producidos durante su biosíntesis, polifenoles, flavonas y antocianinas en la maca estarían relacionados con su actividad antiinflamatoria, anti oxidativa, anticancerígena, entre otros [59]. Cabe recordar que el SOP también representa la unión de diversas enfermedades endocrinas, metabólicas y reproductivas. En los últimos años, se habla de una inflamación asociada al SOP, donde se ha observado una producción aumentada de citoquinas proinflamatorias. Esto está asociado a una disfunción ovárica por el desbalance entre factores proinflamatorios y antiinflamatorios [52]. Es más, se ha sugerido que el glucosinolato de bencilo es responsable del efecto de la maca roja sobre el tamaño de la próstata producida en la hiperplasia prostática benigna [60]. Las propiedades de estos compuestos también pueden mejorar la osteoporosis posmenopáusicas. En ratas ovariectomizadas, *Gonzales C.* sugiere que la maca roja actuaría como un modulador de los receptores de estrógenos [61]. La quercetina, un flavonoide poli fenólico también presente en la raíz de maca se ha estudiado ampliamente en la función reproductiva [50]. Debido a sus capacidades antioxidantes y antiinflamatorias, se ha observado que juega un rol positivo en el balance de hormonas y desordenes metabólicos, además de la regulación de la esteroidogénesis, disminución de quistes ováricos y restauración de la foliculogénesis [51]. Al usar una mezcla hidroalcohólica como sistema de extracción (por ejemplo, extracto hidroalcohólico atomizado de maca roja), se obtiene un producto final con los metabolitos encargados de las propiedades bioactivas de la maca [60]. La acción conjunta de los metabolitos le otorgaría a la maca los beneficios medicinales que ayudarían a mejorar el perfil poliquístico del ovario.

VIII. CONCLUSIONES

En el presente estudio, se determinó la efectividad de la maca roja sobre la histología ovárica de ratas inducidas a ovario poliquístico por la administración de VE/TE. El tratamiento con maca roja ayudó en la recuperación de la estructura ovárica reflejado en la disminución de los quistes foliculares y en el aumento en la formación de nuevos cuerpos lúteos, este último tuvo un aumento más significativo utilizando dosis mayores de maca roja (SOP+MR80) a comparación de los otros tratamientos.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neven ACH, Laven J, Teede HJ, Boyle JA. A summary on polycystic ovary syndrome: Diagnostic criteria, prevalence, clinical manifestations, and management according to the latest international guidelines. *Semin Reprod Med.* 2018;36(1):5-12.
2. Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: Definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(5):270–84.
3. Rodriguez Paris V, Bertoldo M. The Mechanism of Androgen Actions in PCOS Etiology. *Med Sci.* 2019;7(9):1-12.
4. Patel S. Polycystic ovary syndrome (PCOS), an inflammatory, systemic, lifestyle endocrinopathy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2018;182:27-36.
5. Goodarzi M, Dumesic D, Chazenbalk G, Azziz R. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;7(4):219-31.
6. Bulun SE, Adashi E. The Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis. In Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, editors, *Williams Textbook of Endocrinology.* Philadelphia: Elsevier Health Sciences. 2007:587-663
7. Blank S, McCartney C, Marshall J. The origins and sequelae of abnormal neuroendocrine function in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update.* 2006;12(4):351-361.

8. Azziz R. Reproductive endocrinology and infertility: Clinical expert series polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol.* 2018;132(2):321-36.
9. Coutinho E, Kauffman A. The Role of the Brain in the Pathogenesis and Physiology of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Med Sci* 2019;7(8):84.
10. Ablan F. Fisiopatología del síndrome de ovario poliúístico. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2016;76(1): 17-24.
11. Spritzer P, Lecke S, Satler F, Morsch D. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reprod.* 2015;149(5):219-27.
12. Zeng X, Xie Y, Liu Y, et al. Polycystic ovarian syndrome: Correlation between hyperandrogenism, insuline resistance and obesity. *Clin Chim Acta.* 2020;502:214-21.
13. Anagnostis P, Tarlatzis B, Kauffman R. Polycystic ovarian syndrome (PCOS): Long-term metabolic consequences. *Metabol.* 2018;86:33-43.
14. Shukla A, Jamwal R, Bala K. Adverse Effect of Combined Oral Contraceptive Pills. *Asian J Pharm Clin Res.* 2017;10(1): 17-21
15. Lundin C, Danielsson K, Bixo M, Moby L, Bengtsdotter H, Jawad I et al. Combined oral contraceptive use is associated with both improvement and worsening of mood in the different phases of the treatment cycle—A double-blind, placebo-controlled randomized trial. *Psychoneuroendocrinol.* 2017; 76:135-143.
16. Frye C. An overview of oral contraceptives: Mechanism of action and clinical use. *Neurology.* 2006;66(6):29-36.
17. Plu-Bureau G, Maitrot-Mantelet L, Hugon-Rodin J, Canonico M. Hormonal contraceptives and venous thromboembolism: An epidemiological update. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013;27(1):25–34.
18. Peck R, Norris C. Significant Risks of Oral Contraceptives (OCPs). *The Linacre Quarterly.* 2012;79(1):41-56.
19. Mohammadi S, Kayedpoor P, Karimzadeh-Bardei L, Mohammad N. The effect of Curcumin on TNF- α , IL-6 and CRP level in model of Polycystic Ovary Syndrome as an inflammation state. *J Reprod Infertil.* 2017;18(4):352-60.

20. Ghafurniyan H, Nabiuni M, Karimzadeh L. The Effect of Green Tea on IL-6 and CRP level in Model of Polycystic Ovary Syndrome as an Inflammation State. *Int J Cell Mol Biotechnol.* 2014;2014:1–12.
21. Alivandi Farkhad S, Khazali H. Therapeutic effects of isoflavone-aglycone fraction from soybean (*Glycine max* L. Merrill) in rats with estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome as an inflammatory state. *Gynecol Endocrinol.* 2019;35(12):1078-83.
22. Gonzales GF, Villaorduña L, Gasco M, Rubio J, Gonzales C. MACA (*Lepidium meyenii* Walp), UNA REVISIÓN SOBRE SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2014; 31(1): 100-10.
23. Da Silva N, Cabrera L, Medeiros L, Formigoni M, Fuchs R, Droval A, et al. Medicinal effects of Peruvian maca (*Lepidium meyenii*): A review. *Food Funct.* 2020;11(1):83–92
24. Zhu H, Hu B, Hua H, Liu C, Cheng Y, Guo Y et al. Macamides: A review of structures, isolation, therapeutics and prospects. *Food Res Int.* 2020;138:1-21.
25. Gonzales GF, Gasco M, Lozada-Requena I. Role of Maca (*Lepidium meyenii*) Consumption on Serum Interleukin-6 Levels and Health Status in Populations Living in the Peruvian Central Andes over 4000 m of Altitude. *Plant Foods Hum Nut.* 2013;68(4): 347–51.
26. Zheng W, Du S, Tian M, Xu W, Tian Y, Li T, et al. *Lepidium meyenii* Walp Exhibits Anti-Inflammatory Activity against ConA-Induced Acute Hepatitis. *Mediat Inflamm.* 2018; 2018(1): 1-11
27. Wang S, Zhu F. Chemical composition and health effects of maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chem.* 2019;288: 422-43.
28. Vásquez-Velásquez C, Gasco M, Fano-Sizgorich D, Gonzales GF. Inflammatory pathway employed by Red Maca to treat induced benign prostatic hyperplasia in rats. *Andrologia.* 2020:1-8.
29. Gonzales C, Leiva-Revilla J, Rubio J, Gasco M, Gonzales GF. Effect of red maca (*Lepidium meyenii*) on prostate zinc levels in rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. *Andrologia.* 2012;44(1):362-69.

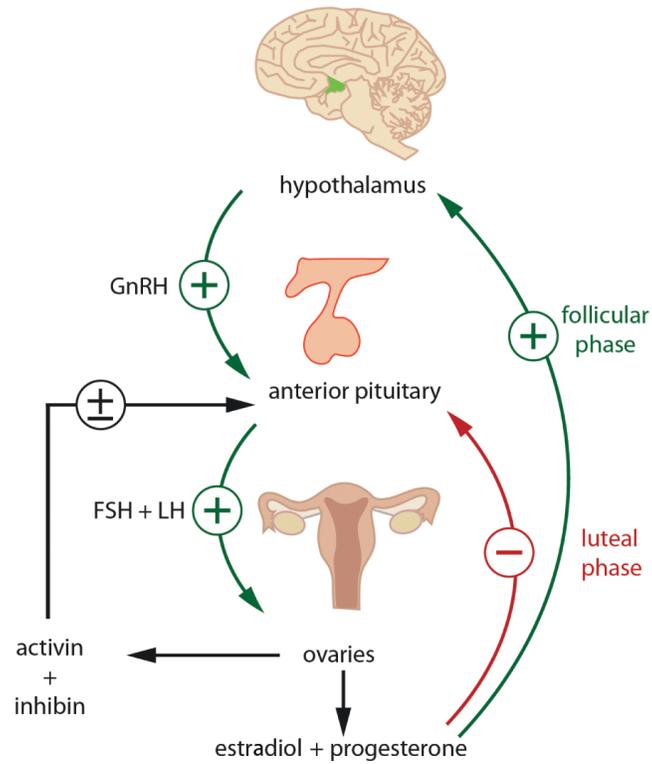
30. Gasco M., Gonzales GF. Efecto diferencial de *Lepidium meyenii* (Maca roja) y finasteride sobre los procesos inflamatorios en la Hiperplasia Prostática Benigna inducida con enantato de testosterona en ratas de la cepa Holtzman. [Tesis de doctorado , Universidad Peruana Cayetano Heredia]. Repositorio digital de tesis y trabajos de investigacion]. 2014.
31. Leiva-Revilla J, Guerra-Castañon F, Olcese-Mori P, Lozada I, Rubio J, Gonzales C, et al. Efecto de la maca roja (*Lepidium meyenii*) sobre los niveles de IFN- γ en ratas ovariectomizadas. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014;31(4):683-8.
32. Divyashree S, Janhavi P, Ravindra P, Muthukumar S. Experimental models of polycystic ovary syndrome: An update. *Life Sciences*. 2019;237:116911.
33. Amini L, Tehranian N, Movahedin M, Ramezani Tehrani F, Soltanghorae H. Polycystic Ovary Morphology (PCOM) in Estradiol Valerate Treated Mouse Model. *Int J Women's Health Reprod Sci*. 2016;4(1):13-17.
34. Fuentes, F., Mendoza, R., Rosales, A., Cisneros, R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Instituto Nacional de Salud. 2010. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/INSI_c333d2b2d03a3bb95081006c54d854b3.
35. Gonzales C., Irma E., Dulce E. Alarcón-Yaquetto A., Zevallos-Concha L., Gasco M., Zhao J., Khan I., Gonzales GF. "Acceptability, Safety, and Efficacy of Oral Administration of Extracts of Black or Red Maca (*Lepidium meyenii*) in Adult Human Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study" *Pharmaceuticals*. 2016;9(3):49.
36. Nallathambi A., Bhargavan R. Regulation of estrous cycle by *Cynodon dactylon* in letrozole induced polycystic ovarian syndrome in Wistars albino rats. *Anatomy and Cell Biology*. 2019;52(4): 511–517.
37. Nofal, EA., El-Habeby, MM., El-Kholy, WB., El-Akabawy, GF., Faried, MA. Protective role of broccoli extract on estradiol valerate-induced polycystic ovary syndrome in female rats. *European Journal of Anatomy*. 2019;23(2): 121–129.
38. Badawi, A. M., Ebrahim, N. A., Ahmed, S. B., Hassan, A. A., & Khaled, D. M. The possible protective effect of *Bougainvillea spectabilis* leaves extract on estradiol

- valerate-induced polycystic ovary syndrome in rats (biochemical and histological study). *European Journal of Anatomy*. 2018;2(6): 461–469.
39. Mehraban, M., Jelodar, G., & Rahmanifar, F. A combination of spearmint and flaxseed extract improved endocrine and histomorphology of ovary in experimental PCOS. *Journal of Ovarian Research*. 2020;13(1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/S13048-020-00633-8/FIGURES/5>
 40. Noorafshan, A., Ahmadi, M., Mesbah, S. F., & Karbalay-Doust, S. Stereological study of the effects of letrozole and estradiol valerate treatment on the ovary of rats. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. 2013;40(3): 115–121. <https://doi.org/10.5653/cerm.2013.40.3.115>
 41. Kalhori, Z., Mehranjani, M. S., Azadbakht, M., & Shariatzadeh, M. A. Ovary stereological features and serum biochemical factors following induction of polycystic ovary syndrome with testosterone enanthate in mice: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*. 2018;16(4): 267–274. <https://doi.org/10.29252/ijrm.16.4.267>
 42. Brawer, J. R., Munoz, M., & Farookhi, R. Development of the polycystic ovarian condition (PCO) in the estradiol valerate-treated rat. *Biology of Reproduction*. 1986;35(3): 647–655. <https://doi.org/10.1095/biolreprod35.3.647>
 43. Franks, S., Stark, J., & Hardy, K. Follicle dynamics and anovulation in polycystic ovary syndrome. *Human Reproduction Update*. 2008;14(4): 367–378. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn015>
 44. Mirabolghasemi, G., & Kamyab, Z. Changes of the uterine tissue in rats with polycystic ovary syndrome induced by estradiol valerate. *International Journal of Fertility and Sterility* 2017;11(1): 47–54. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.4794>
 45. He, F., Zhang, W., & Zhang, H. Apoptotic signaling pathways in uteri of rats with endometrial hyperplasia induced by ovariectomy combined with estrogen. *Gynecologic and Obstetric Investigation*. 2013;76(1): 51–56. <https://doi.org/10.1159/000351109>
 46. Gonzales, C., Cárdenas-Valencia, I., Leiva-Revilla, J., Anza-Ramirez, C., Rubio, J., & Gonzales, G. F. Effects of different varieties of Maca (*Lepidium meyenii*) on bone

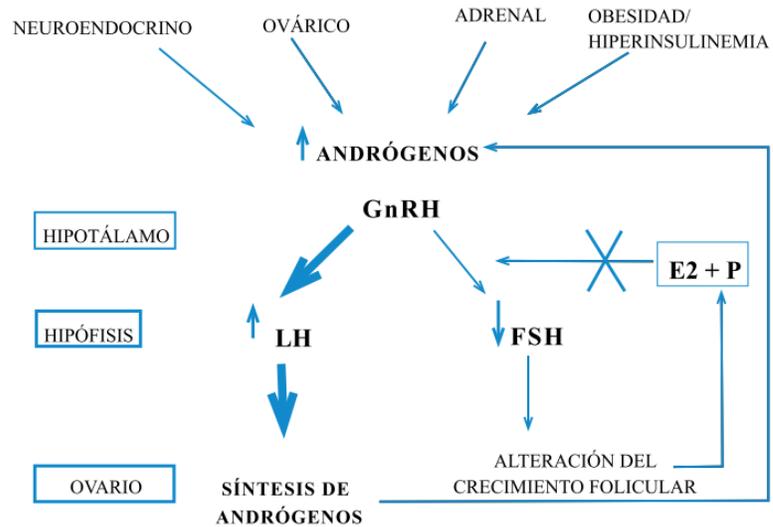
- structure in ovariectomized rats. *Forschende Komplementarmedizin*. 2010;17(3): 137–143. <https://doi.org/10.1159/000315214>
47. Sánchez JML, Serrano ZA, Durán JA, Morales HSG, Álvarez PBM. Peruvian Maca and Possible Impact on Fertility. *J Nutr Health Food Eng*. 2017;6(5): 00217. DOI: 10.15406/jnhfe.2017.06.00217
48. Gonzales GF. Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:193496. doi: 10.1155/2012/193496.
49. Zhang, Y., Yu, L., Jin, W., & Ao, M. (2014). Effect of ethanolic extract of *Lepidium meyenii* Walp on serum hormone levels in ovariectomized rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 46(4), 416–419.
50. Wang, S., Zhu, F. Chemical composition and health effects of maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*. 2019(288):422–443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.071>
51. Rashidi, Z., Khosravizadeh, Z., Talebi, A., Khodamoradi, K., Ebrahimi, R., Amidi, F. Overview of biological effects of Quercetin on ovary. *Phytotherapy Research*. 2021;35(1): 33–49. <https://doi.org/10.1002/ptr.6750>
52. Rostamtabar, M., Esmaeilzadeh, S., Tourani, M., Rahmani, A., Bae, M., Shirafkan, F., Saleki, K., Mirzababayi, S. S., Ebrahimpour, S., Nouri, H. R. Pathophysiological roles of chronic low-grade inflammation mediators in polycystic ovary syndrome. *Journal of Cellular Physiology*. 2021;236(2): 824–838. <https://doi.org/10.1002/jcp.29912>
53. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. Corpus luteum. *Encyclopedia Britannica*. 2020
54. Davis J. Mouse and Rat Anesthesia and Analgesia. *Curr Protoc Neurosci*. 2008;42(1).
55. Engler A. *Syllabus der Pflanzenfamilien*. Vol. 1. German. 1964
56. Fernández Romero Tammy, Suárez Román Gipsis, Clapés Hernández Sonia. Protocolo para la citología vaginal directa de ratas de laboratorio. *Rev haban cienc méd*. 2021; 20(3).

57. STANDARD OPERATING PROCEDURE #420 ESTROUS CYCLE ASSESSMENT IN RODENTS. McGill Available from: https://www.mcgill.ca/research/files/research/420-_estrous_cycle_assessment_in_rodents_-_july_2021_0.pdf
58. Yábar Villanueva E. LA MACA (LEPIDIUM MEYENII WALPERS) ALIMENTO FUNCIONAL ANDINO: BIOACTIVOS, BIOQUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA. Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research. 2019 Apr 30;21(2):139–52.
59. Ulloa Del Carpio N, Alvarado-Corella D, Quiñones-Laveriano DM, et al. Exploring the chemical and pharmacological variability of *Lepidium meyenii*: a comprehensive review of the effects of maca. Frontiers in Pharmacology. 2024 ;15:1360422. DOI: 10.3389/fphar.2024.1360422. PMID: 38440178; PMCID: PMC10910417.
60. Gonzales GF, Vasquez V, Rodriguez D, Maldonado C, Mormontoy J, Portella J, et al. Effect of two different extracts of red maca in male rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. Asian Journal of Andrology. 2007;9(2):245–51.
61. Gonzales C, Cárdenas-Valencia I, Leiva-Revilla J, Anza-Ramirez C, Rubio J, Gonzales GF. Effects of different varieties of Maca (*Lepidium meyenii*) on bone structure in ovariectomized rats. Forsch Komplementmed. 2010;17(3):137-43. doi: 10.1159/000315214. Epub 2010 Jun 16. PMID: 20616517.

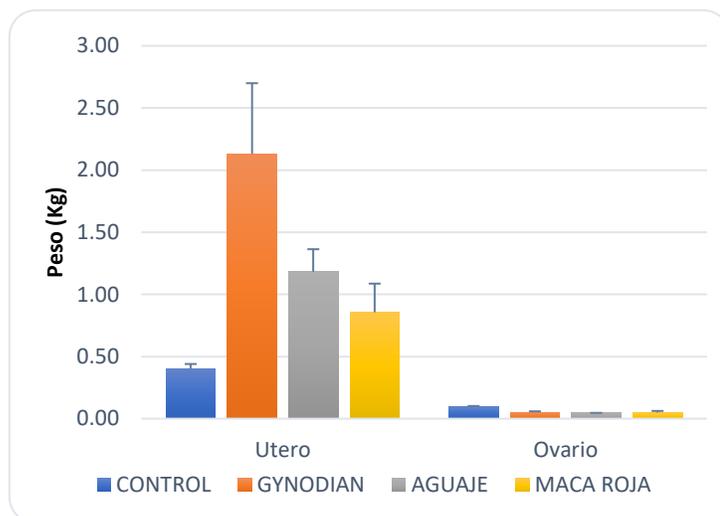
X. ANEXOS



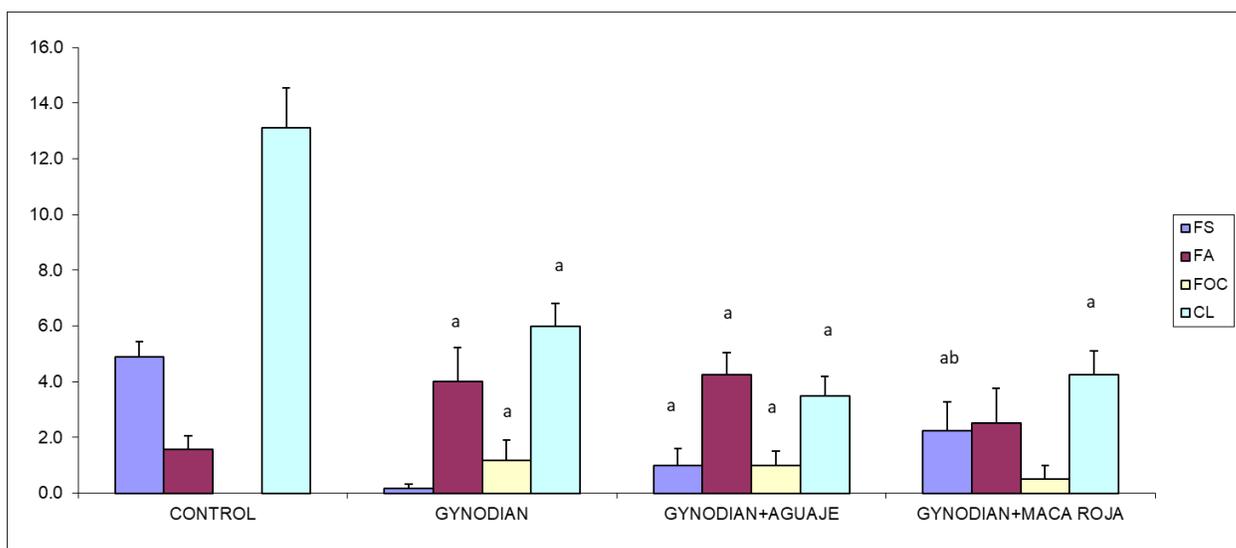
Anexo N°1: Esquema del Eje Hipotálamo-Pituitario-Ovario



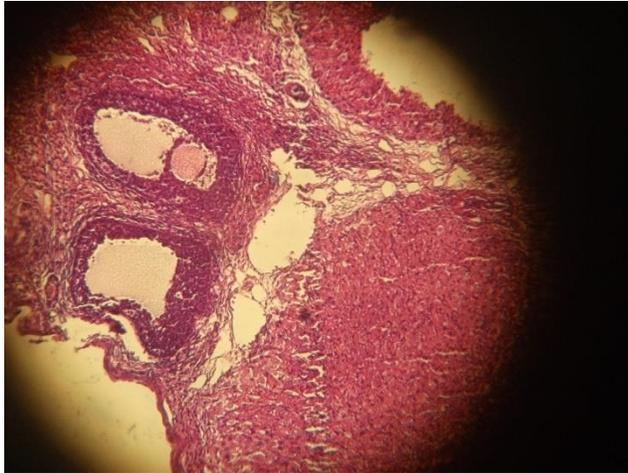
Anexo N°2: Fisiopatología del Síndrome de Ovario Poliquístico.



Anexo N°3: Efecto de diferentes tratamientos sobre el peso de organos reproductivos
 [Manuel Gasco, datos no publicados – Laboratorio de Endocrinología y Reproducción – UPCH]



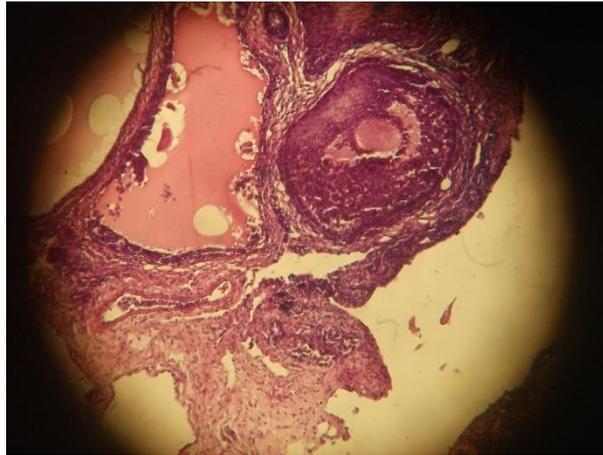
Anexo N°4: Efecto de los diferentes tratamientos sobre la estructura del tejido ovárico (FS: Folículos saludables; FA: Folículos atrésicos; FOC: Folículos con ovulo central; CL: Cuerpos lúteos) [Manuel Gasco, datos no publicados – Laboratorio de Endocrinología y Reproducción – UPCH]



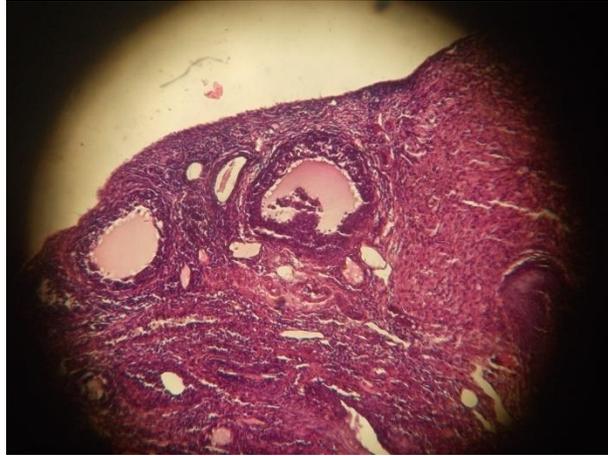
Anexo N°5: Corte histológico de ovario de rata del grupo control [Manuel Gasco, datos no publicados – Laboratorio de Endocrinología y Reproducción – UPCH]



Anexo N°6: Corte histológico de ovario de rata del grupo con síndrome de Ovario Poliquístico (SOP) [Manuel Gasco, datos no publicados – Laboratorio de Endocrinología y Reproducción – UPCH]



Anexo N°7: Corte histológico de ovario de rata inducido a SOP tratado con aguaje [Manuel Gasco, datos no publicados – Laboratorio de Endocrinología y Reproducción – UPCH]



Anexo N°8: Corte histológico de ovario de rata inducido a SOP tratado con maca roja [Manuel Gasco, datos no publicados – Laboratorio de Endocrinología y Reproducción – UPCH]