



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**Facultad de Ciencias e Ingeniería**

Efecto protector y antioxidante de *Lepidium meyenii* (maca) sobre la espermatogénesis en ratas inducidas a estrés oxidativo por acetato de plomo.

Tesis para optar el Título profesional de Licenciado en  
Nutrición

**AUTORES**

Emelyn Lizbeth Guerrero Aliaga  
Sebastian Rodrigo Holguino Puma

**ASESOR**

Dr. Manuel Enrique Gasco Tantachuco

**Lima-Perú**

**2024**

*A Dios, por haberme guiado y dado la fuerza para culminar este proyecto.  
A mis padres, Anthony Guerrero y Rebeca Aliaga,  
por su amor incondicional, apoyo y sacrificio.  
Su presencia en mi vida ha sido fundamental para llegar a donde estoy hoy.  
Gracias por creer en mí y estar ahí para mí.*

**Emelyn Lizbeth Guerrero Aliaga**

*A mis padres, Sonia Puma y Efraín Holguino quienes han sido  
el pilar principal a lo largo de este viaje académico.  
Su confianza plena e incondicional apoyo han sido  
el motor que me ha impulsado a seguir adelante.  
Su sacrificio y dedicación han sido cruciales para alcanzar este logro,  
y no podría haber llegado hasta aquí sin su respaldo constante.*

**Sebastian Rodrigo Holguino Puma**

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro asesor Dr. Manuel Gasco, quien con su experiencia, conocimiento y dedicación nos guio en el camino a obtener el título profesional. Su orientación y consejos fueron fundamentales para superar los desafíos que se presentaron en el camino.

A todos los integrantes del laboratorio de Endocrinología y Reproducción, especialmente a la Dra. Vilma Tapia, a Dra. Diana Alcántara y al Dr. Gustavo Gonzales, por su apoyo incondicional y confianza en nosotros.

A nuestro querido amigo Joseph Melo, por haber sido un compañero incondicional, que con su carisma y alegría nos impulsó a terminar el proyecto de tesis.

A nuestros amigos, quienes nos brindaron su apoyo y motivación durante este proceso. Con sus palabras de aliento nos incentivaron a continuar y no caer en este arduo camino.

# Uigict FACI FAVEZ

## Efecto protector y antioxidante de *Lepidium meyenii* (maca) sobre la espermatogénesis en ratas inducidas a estrés oxidati...

Emelyn Lizbeth Guerrero Aliaga  
OCTUBRE Y NOVIEMBRE 2024  
Universidad Peruana Cayetano Heredia

### Detalles del documento

Identificador de la entrega  
trn:oid::1:3092610041

Fecha de entrega  
25 nov 2024, 11:33 a.m. GMT-5

Fecha de descarga  
26 nov 2024, 8:35 a.m. GMT-5

Nombre de archivo  
TESIS\_TURNITIN\_1.docx

Tamaño de archivo  
10.6 MB

48 Páginas  
12,683 Palabras  
67,688 Caracteres

## 8% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas

### Filtrado desde el informe

- Bibliografía
- Texto citado

### Fuentes principales

- 8% Fuentes de Internet
- 2% Publicaciones
- 1% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

### Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

- Caracteres reemplazados**  
44 caracteres sospechosos en N.º de páginas  
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

# ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>1.1 MARCO TEÓRICO</b> .....	6
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN</b> .....	15
<b>III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	17
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	17
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	17
- <b>Objetivo general</b> .....	17
- <b>Objetivos específicos</b> .....	17
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	18
a) <b>Animales de experimentación</b> .....	18
b) <b>Preparación del extracto acuoso de maca negra</b> .....	18
c) <b>Alteración de la espermatogénesis por tratamiento con acetato de plomo</b> .....	19
d) <b>Modelo experimental</b> .....	19
e) <b>Tamaño de muestra</b> .....	22
f) <b>Variables</b> .....	23
g) <b>Recolección de órganos sexuales</b> .....	25
h) <b>Evaluación del conteo espermático en epidídimo y conducto deferente</b> .....	25
i) <b>Evaluación de histología por medio de cortes histológicos</b> .....	26
j) <b>Cálculo del grosor de los túbulos seminíferos en testículo por medio de cortes histológicos</b> .....	27
k) <b>Evaluación del estrés oxidativo en testículo</b> .....	27
l) <b>Análisis estadístico</b> .....	28
m) <b>Consideraciones éticas</b> .....	29
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	30
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	42
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	48
<b>X. LIMITACIONES</b> .....	48
<b>XI. FORTALEZAS</b> .....	49
<b>XII. RECOMENDACIONES</b> .....	49
<b>XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	50
<b>XIV. ANEXOS</b> .....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura N°1.** Flujograma experimental
- Figura N°2.** Delta de los pesos corporales de las ratas adultas.
- Figura N°3.** Pesos de testículos de ratas adultas después del tratamiento.
- Figura N°4.** Pesos de epidídimos de ratas adultas después de tratamiento.
- Figura N°5.** Conteo de espermatozoides en conducto deferente de ratas adulto macho.
- Figura N°6.** Conteo de espermatozoides en epidídimo de ratas adulto macho.
- Figura N°7.** Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Figura N°8.** Asociación entre la concentración de MDA (nM/gr de proteína) y el conteo de espermatozoides en el conducto deferente ( $\times 10^6$ ) en ratas adultos macho.
- Figura N°9.** Asociación entre la concentración de MDA (nM/gr de proteína) y el conteo de espermatozoides en el epidídimo ( $\times 10^6$ ) en ratas adultos macho.
- Figura N°10.** Grosor del epitelio de los túbulos seminíferos (um).
- Figura N°11.** Asociación entre la concentración de MDA (nM/gr de proteína) y el grosor de túbulos seminíferos (um) en ratas adultos macho.
- Figura N°12.** Histología del testículo izquierdo de ratas adultos macho.
- Figura N°13.** Histología de la cola del epidídimo de ratas adultos macho.
- Figura N° 14.** Flujograma del proceso de conteo de espermatozoides en epidídimo
- Figura N°15.** Flujograma del proceso de conteo de espermatozoides en conducto deferente
- Figura N°16.** Conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer.
- Figura N°17.** Curvas estándar del malondialdehído (MDA).
- Figura N°18.** Curva de calibración de proteínas.
- Figura N°19.** Adaptación de animales experimentales.
- Figura N°20.** Toxicidad por acetato de plomo.

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla N°1.** Información Nutricional de la Maca Negra marca Juvens
- Tabla N°2.** Organización de los grupos experimentales y tratamiento dado.
- Tabla N°3.** Operacionalización de variables
- Tabla N°4.** Histología del tubo seminífero y epidídimo afectados por acetato de plomo

## Glosario de Términos

<b>Pb</b>	Plomo
<b>AcPb</b>	Acetato de plomo
<b>MN</b>	Maca negra
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>mg/kg</b>	Miligramos por kilo de peso
<b>mg/kg/día</b>	Miligramos por kilo de peso por día
<b>mg/ml</b>	Miligramos por mililitros
<b>mg/día</b>	Miligramo por día
<b>ml/día</b>	Mililitro por día
<b>um</b>	Micrómetros
<b>ECNT</b>	Enfermedades crónicas no transmisibles
<b>EEM</b>	Extracto etanólico de maca
<b>PUFAs</b>	Ácidos grasos poliinsaturados.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>THC</b>	Tetrahidrocannabinol
<b>H2O2</b>	Peróxido de hidrógeno
<b>ALA</b>	Ácido aminolevulínico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>CDD</b>	Conducto deferente delgado
<b>CDG</b>	Conducto deferente grueso
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>TBARS</b>	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
<b>ES</b>	Espermatozoides
<b>EG</b>	Espermatogonias
<b>L</b>	Luz del túbulo seminífero
<b>I</b>	Espacio intersticial
<b>Le</b>	Luz del túbulo epididimario

## RESUMEN

*Lepidium meyenii* es una planta con diversas propiedades biológicas beneficiosas, siendo la variedad negra la más relacionada con la salud reproductiva masculina. Las evidencias señalan que la administración de maca negra en animales experimentales mejora la calidad seminal, luego de alterar la espermatogénesis con plomo; sin embargo, no se ha dilucidado aún los mecanismos fisiológicos y moleculares que expliquen los efectos de la maca negra sobre la fertilidad masculina en un modelo de estrés oxidativo inducido por plomo. **Objetivo:** Determinar si la acción antioxidante del extracto acuoso de maca negra protege la disminución de la espermatogénesis inducida por exposición al acetato de plomo en ratas adultas. El presente proyecto contribuye a sentar las bases para el planteamiento de posibles líneas profilácticas en contra de la infertilidad masculina, asimismo, permite futuras investigaciones clínicas en humanos expuestos a plomo. **Metodología:** Se utilizaron 36 ratas macho organizadas en 6 grupos: al grupo control se le inyectó acetato de sodio vía ip.; a los grupos Pb8 y Pb16 se les inyectó 8 mg/kg y 16 mg/kg de acetato de plomo (AcPb), respectivamente. A los grupos MN+Pb8 y MN+Pb16 se le administró concomitantemente 50 mg/día de extracto acuoso de maca negra con acetato de plomo a 8 mg/kg y 16 mg/kg, respectivamente. Al grupo MN, solo se le administraron 50 mg/día de extracto acuoso de maca. Se efectuaron diversos ensayos tales como el conteo de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente, asimismo se evaluó la histología en testículo y epidídimo por medio de cortes histológicos. Además, se observó el grado de estrés oxidativo y el efecto antioxidante con la técnica del TBARS, en testículos. **Resultados:** Según el diseño experimental, se determina que la maca negra a una dosis de 50 mg/día aumenta significativamente el conteo de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente comparando el grupo que solo se administró AcPb a una dosis alta (Pb16) con el grupo que se les administró maca más AcPb a la misma dosis (MN+ Pb16). Además, se observó según la histología que la maca logró aumentar el almacenamiento de espermatozoides en el epidídimo y mejoró la estructura del tejido en el testículo. Asimismo, no se ha encontrado que la maca negra disminuya de manera significativa el MDA en testículo. **Conclusiones:** La maca negra protege la espermatogénesis de la toxicidad del acetato de plomo en los órganos reproductivos masculinos, sin embargo, no a través de un mecanismo antioxidante. **PALABRAS CLAVE:** maca negra, estrés oxidativo, espermatogénesis, efecto antioxidante, acetato de plomo.

## **ABSTRACT**

*Lepidium meyenii* is a plant with various beneficial biological properties, with the black variety being most associated with male reproductive health. Evidence indicates that the administration of black maca in experimental animals improves seminal quality after altering spermatogenesis with lead; however, the physiological and molecular mechanisms explaining the effects of black maca on male fertility in a lead-induced oxidative stress model have not yet been elucidated. **Objective:** To determine if the antioxidant action of the aqueous extract of black maca protects against the decrease in spermatogenesis induced by lead acetate exposure in adult rats. This project contributes to laying the groundwork for proposing possible prophylactic approaches against male infertility and allows for future clinical research in humans exposed to lead. **Methodology:** 36 male rats were organized into 6 groups: the control group was injected with sodium acetate; Lead 8 and Lead 16 groups were injected with 8 mg/kg and 16 mg/kg of lead acetate (PbAc), respectively. The BM+Lead 8 and BM+Lead 16 groups were concomitantly administered 50 mg/day of aqueous black maca extract with lead acetate at 8 mg/kg and 16 mg/kg, respectively. The BM group was only administered 50 mg/day of aqueous maca extract. Various tests were performed, such as sperm count in the epididymis and vas deferens, and testicular histology was evaluated through histological sections. Additionally, the degree of oxidative stress and antioxidant effect were observed using the TBARS technique in testes. **Results:** According to the experimental design, it is determined that black maca at a dose of 50 mg/day significantly increases the sperm count in epididymis and vas deferens when comparing the group that was only administered PbAc at a high dose (Lead 16) with the group that was administered maca plus PbAc at the same dose (BM+Lead 16). Furthermore, histology showed that maca managed to increase sperm storage in the epididymis and improved tissue structure in the testicle. Additionally, black maca has not been found to significantly decrease MDA in the testicle. **Conclusions:** Black maca protects spermatogenesis from lead acetate toxicity in male reproductive organs, however, not through an antioxidant mechanism.

**KEYWORDS:** black maca, oxidative stress, spermatogenesis, antioxidant effect, lead acetate.

## I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, ha aumentado la carga sanitaria debido al incremento de las enfermedades, especialmente las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) que son causantes del 70% de muertes a nivel global. En este contexto, creció drásticamente el interés en el consumo de plantas/hierbas/alimentos para prevenir o tratar las enfermedades; dichos alimentos se conocen como alimentos funcionales ya que poseen un potencial beneficioso para la salud debido a sus bioactivos que, en estudios, se ha visto poseer actividad antioxidante, anticancerígena, antiinflamatoria y anti lipídica en diferentes patologías [1].

En Perú, se encuentra una mega diversidad de plantas, entre las cuales la maca ha llamado la atención de muchos investigadores; *Lepidium meyenii* (maca) es una planta, perteneciente a la familia Brassicaceae, que principalmente se cultiva y crece en los Andes centrales del Perú a altitudes mayores de 3500 msnm [2,3]. Existe una gran variedad de tipos de maca como la maca negra, amarilla y roja, que difieren en sus propiedades biológicas [4]. Asimismo, la maca presenta dos etapas bien definidas de su ciclo de vida que son: la “vegetativa” en donde se desarrolla la raíz o hipocótilo, parte comúnmente usada como alimento debido a sus propiedades nutricionales y medicinales; y la etapa “reproductiva” en donde se produce la semilla botánica [3,4].

Las propiedades nutricionales y medicinales de la maca se deben principalmente a sus metabolitos secundarios como los glucosinolatos, los macaenos, macamidas y aminoácidos con gran cantidad de prolina, uridina y ácido málico, que se encuentran en el hipocótilo [4]. Con respecto a ello, se conoce que la administración de la maca ayuda a mejorar la salud reproductiva masculina, aumentando y protegiendo la espermatogénesis [5].

Por otro lado, se estima que entre el 8-12% de las parejas presentan problemas de infertilidad en todo el mundo, del cual el 50% se le atribuye al hombre. La causa de la infertilidad masculina es multifactorial, pero se destaca que el 50% son idiopáticas, en donde 37 millones de hombres presenta infertilidad por estrés oxidativo [6]; este fenómeno se da cuando hay un desequilibrio en la producción y acumulación de especies reactivas de oxígenos (ROS) que sobrepasan la defensa antioxidante del organismo. Los

ROS pueden ser producidos de manera endógena a bajas concentraciones, para diferentes procesos fisiológicos, y exógeno resultado de la exposición a xenobióticos, químicos, contaminantes ambientales, estilos de vida nocivos, radiación y metales pesados [7]. En los últimos años, ha surgido un campo de investigación que estudian las implicancias de la exposición a metales pesados; dentro de ello, el estrés oxidativo es uno de los mecanismos moleculares que subyacen la toxicidad inducida por metales pesados como el arsénico, cadmio, plomo, etc. La presente investigación se centrará en el estrés oxidativo inducido por plomo (Pb) y su implicancia en la salud reproductiva masculina; el plomo es un tóxico ambiental de uso común y ampliamente distribuido en la industria de fabricación de baterías, equipos electrónicos; pintura; cerámica vitrificada; y generalmente, se usa como material de revestimiento para soldaduras debido a su bajo punto de fusión y maleabilidad [8].

Una revisión sistemática, mostró que la exposición a Pb puede generar ROS en público general y personas ocupacionalmente expuestas. Los estudios observaron al menos un biomarcador de estrés oxidativo y/o concentración de enzimas antioxidantes versus la concentración de plomo sérico. En líneas generales, se ha visto una correlación positiva entre biomarcadores de estrés oxidativo como el malondialdehído y concentraciones elevadas como bajas de plomo sérico; y en contraparte, una correlación negativa con la concentración de enzimas antioxidantes como el superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa versus la concentración elevada de plomo sérico, sin embargo, a concentraciones bajas de plomo se ha visto un aumento de las defensas antioxidantes [9]. En adición, un estudio experimental en ratas, reportó los mismos resultados en órganos reproductivos masculino, donde la administración aguda (30 mg/kg x 7d) de acetato de plomo produjo aumento de la concentración de MDA y disminuyó la actividad de la SOD, CAT y GPx, asimismo, se observó daño histopatológico en los testículos afectando negativamente la espermatogénesis y la calidad del semen [10]. Otro estudio realizado en humanos evaluó el efecto de tres biomarcadores de estrés oxidativo en orina (8-hidroxi-2-desoxiguanosina, 8-iso-prostaglandina F<sub>2α</sub> y ácido 4-hidroxi-2-nonenal-mercaptúrico) en relación con el plomo y la calidad del semen, se reportó una asociación negativa entre la concentración de plomo urinario y porcentaje de morfología normal de espermatozoides [11]. No se tiene una terapia específica y complementaria eficaz para contrarrestar los efectos del estrés oxidativo, por ello se opta por prevenir la formación

de ROS, esto podría lograrse a través de alimentos funcionales como la maca negra, ya que esta planta milenaria que ha demostrado tener efectos positivos sobre la espermatogénesis y salud reproductiva masculina en general. Sin embargo, hay pocos estudios sobre cómo la maca negra modula el estrés oxidativo inducido por plomo en órganos reproductivos masculinos. La hipótesis que planteamos es que la maca negra modula la toxicidad del plomo al disminuir el estrés oxidativo. De hecho, hay antecedentes de mecanismos de protección de la maca negra en modelos de infertilidad inducida por estrés oxidativo. Un estudio evaluó el efecto de la administración de tetrahidrocannabinol (THC), maca y su combinación en los parámetros del tejido testicular y del semen, los autores notaron que la administración oral de maca previene el daño que causa el THC en los testículos y espermatogénesis, concluyendo que la maca podría estar evitando la apoptosis de las células germinales en desarrollo, y a su vez mejorando el progreso del número de células a través de la espermatogénesis [12]. En adición, otro estudio propuso un modelo de estrés oxidativo testicular inducido por corticosterona, en ratas Wistar, en donde evaluaron el efecto protector del extracto etanólico de maca (EEM), el cual contiene nueve macamidas, a una dosis de 400 mg/kg de peso corporal; así como dosis aisladas de una sola macamida denominada octadecatrienamida (M 18:3) a concentraciones de 5 y 25 mg/kg de peso. Los autores reportaron que, la corticosterona redujo el número de espermatogonias, espermatocitos primarios y espermatozoides en cortes histológicos de túbulos seminíferos; así como, una disminución de las enzimas antioxidantes y cinemática de los espermatozoides. Dichos efectos se previnieron al administrar EEM y M 18:3, con diferencias entre las variables observadas; no obstante, el mayor efecto significativo se evidenció con el tratamiento de EEM y la dosis mayor de M 18:3 [13]. Otros estudios, también han determinado que es muy probable que los metabolitos secundarios y antioxidantes de la maca negra mejoren la calidad del semen y generen un mayor efecto sobre el sistema reproductivo del hombre. Esto gracias a las macamidas y macaenos que representan un grupo de ácidos grasos saturados de cadena larga y ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), los cuales actúan como antioxidantes. Además, se conoce que existe una correlación entre el consumo de dieta y la concentración de PUFAs en el semen de diferentes especies. Un estudio realizado en caballos, determinó que la ingesta dietética de PUFA aumenta la calidad del semen durante el enfriamiento, posiblemente por un cambio en la composición lipídica

de los componentes esenciales de la membrana, los cuales mejoran su estabilidad y también reducen la vulnerabilidad al estrés oxidativo durante el enfriamiento [14].

En adición, en un estudio previo se demostró que la maca revierte el efecto dañino producido por el plomo sobre la espermatogénesis en ratas. En esta investigación, los autores determinaron que, el tratamiento con plomo durante 35 días a dosis de 8 y 16 mg/kg sí tiene un efecto negativo en la reproducción masculina, ya que disminuye el peso de los órganos reproductivos (*testículos, epidídimo, vesículas seminales y próstata ventral*) y el recuento, motilidad y producción de espermatozoides; no obstante, se observó un aumento en el conteo de espermatozoides en el testículo y epidídimo al administrar la maca a la mitad del tiempo de tratamiento con acetato de plomo (desde el día 18 al 35). Asimismo, en el estudio se demostró que el acetato de plomo disminuyó significativamente la longitud de las siguientes etapas: VII-VIII, donde se da la espermiación (maduración de los espermatozoides); y IX-XI, donde se encuentran las espermatogonias y se empiezan a dividir por mitosis. Sin embargo, los autores determinaron que, al dar el tratamiento con maca, revirtió el daño en las longitudes de los estadios mencionados [15].

## 1.1 MARCO TEÓRICO

### 1. Estrés oxidativo:

El estrés oxidativo se da cuando hay exceso en la producción y acumulación de especies reactivas de oxígeno que sobrepasan la capacidad antioxidante del organismo. Las especies reactivas de oxígeno son moléculas derivadas del O<sub>2</sub> como la superóxido, peróxido de hidrógeno, radical de hidroxilo, el ozono y oxígeno singlete. La producción de ROS puede ser endógena, cumpliendo diversas funciones fisiológicas como la fosforilación de proteínas; diferenciación, crecimiento y muerte celular; procesos inmunitarios; señalización celular, etc. Las fuentes exógenas de ROS son los xenobióticos, químicos, contaminantes ambientales, estilos de vida nocivos, radiación y metales pesados [7]. Hay dos vías principales mediante las cuales el estrés oxidativo contribuye a la fisiopatología de diversas enfermedades. La primera se da por una

sobreproducción y acumulación de ROS, estos atacan las macromoléculas (lípidos, proteínas, ADN) generando daño celular y tisular que en última instancia terminará en la muerte celular. El segundo mecanismo es a través de una señalización redox aberrante, ya que la sobrecarga de oxidantes interfiere con la capacidad de la célula para utilizar adecuadamente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como molécula de señalización para regular las funciones biológicas normales [16]. Las ROS en concentraciones controladas desempeñan funciones importantes en muchos aspectos de la capacidad reproductiva masculina como la activación, maduración, capacitación y respuesta acrosómica, así como la fusión del espermatozoide-ovocito. No obstante, los espermatozoides son especialmente susceptibles al estrés oxidativo debido a que presentan una elevada cantidad de ácidos grasos poliinsaturados en su membrana plasmática; la oxidación de dichos ácidos grasos desencadena una serie de eventos denominado lipoperoxidación, esto daña la membrana, por consiguiente, se afecta la funcionalidad y supervivencia de los espermatozoides, disminuyendo el potencial de fertilización. En adición, los ROS podrían oxidar proteínas y ácidos nucleicos afectando la estructura conformacional y fragmentando el ADN, respectivamente. Ambos procesos afectan a aspectos fisiológicos del semen como una deficiente motilidad, empaquetamiento del ADN; anomalías embrionarias, mutaciones y mayor riesgo de aborto espontáneo [17].

## **2. Acetato de plomo**

El plomo es un tóxico ambiental de uso común en la industria de fabricación de baterías, equipos electrónicos; pintura; cerámica vitrificada; y generalmente, se usa como material de revestimiento para soldaduras debido a su bajo punto de fusión y maleabilidad [18]. El Pb tiene tres vías de acceso al organismo, a través del sistema respiratorio, gastrointestinal y cutáneo. La vía más prevalente es mediante el sistema respiratorio seguido del gastrointestinal y cutáneo. Una vez en el cuerpo el Pb penetra fácilmente las células y se distribuye en el cuerpo ya que, ingresa por los mismos transportadores de los cationes necesarios para el organismo (Ca<sup>+</sup>, Zn, Se, Mg, Na entre otros). Una vez en el torrente sanguíneo, el 95% del Pb ataca a los lípidos y proteínas del eritrocito como las enzimas ácido

aminolevulínico deshidratasa, ácido aminolevulínico sintetasa y ferroquelatasa, enzimas de la vía de síntesis del grupo Hemo, esto da como resultado un aumento en la retención de ácido aminolevulínico (ALA) lo que causa hemólisis. Tanto la acumulación de ALA como la destrucción del eritrocito propician la formación de peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo [19]. Por otro lado, una pequeña fracción del Pb se transporta como ion libre a los diferentes tejidos; en ellos ejerce un mecanismo de toxicidad basado en la capacidad de sustituir cationes polivalentes en los sitios de unión de proteínas. De tal manera que, una forma indirecta de inducir estrés oxidativo es a través de la inhibición de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión reductasa; esto debido a que el Pb ocupa el sitio de unión de cofactores metálicos desencadenando cambios conformacionales que alteran la funcionalidad. Asimismo, forma compuesto insolubles con cofactores aniónicos, disminuyendo su disponibilidad para las enzimas antioxidantes. En adición, el Pb afecta la homeostasis del calcio ocasionando su acumulación en la célula dando lugar a la apertura del poro de transición mitocondrial lo cual conduce a la despolarización mitocondrial, provocando la degeneración del metabolismo energético, propiciando la generación de radicales libres, y en última instancia, la muerte celular [20]. En adición, el Pb unido a los glóbulos rojos también se distribuye desde la sangre a los tejidos blandos como los riñones, hígados, la médula ósea y el sistema nervioso central, los principales objetivos de la toxicidad del plomo. Posteriormente, entre uno a dos meses después, el 90% del Pb difunde y se reserva en los huesos en donde es inerte y no tóxico. El plomo restante se elimina en un 90% a través de la orina y menor magnitud en bilis, sudor, leche materna, piel, cabello y uñas [21]

### **3. Espermatogénesis**

La espermatogénesis es un proceso esencial, único y completo que se lleva a cabo en los testículos, específicamente en los túbulos seminíferos. En el cual, se da la producción de espermatozoides maduros a partir de espermatogonias (células germinales inmaduras). Gracias a este proceso, se produce la cantidad necesaria de espermatozoides funcionales, capaces de fecundar un ovocito y dar lugar a un

nuevo ser; por esta razón, la fertilidad masculina depende de ello [5]. En el humano, la espermatogénesis dura 74 días; en el caso de la rata dura 65 días. Este proceso comienza a partir de la pubertad y termina cuando el individuo muere [22].

### **3.1. Fases de la espermatogénesis**

La espermatogénesis se divide en 3 fases: mitosis o espermatocitogénesis, meiosis y espermiogénesis [22].

#### **3.1.1 Mitosis o espermatocitogénesis**

La mitosis es la primera fase de la espermatogénesis, en la cual las espermatogonias migran hacia la luz central del túbulo seminífero entre las células de Sertoli con el fin de convertirse en espermatocitos primarios. En esta fase, las células de Sertoli cumplen la función de rodear las espermatogonias en desarrollo y llevarlas hasta la luz central del túbulo, esto es gracias al gran tamaño de las células y a su cubierta citoplasmática [23]. En la rata, las espermatogonias se dividen convirtiéndose en tipo A0, tipo A1-A4, las intermedias, y la tipo B [24], las cuales son células relativamente inmaduras que sufren cambios en su estructura y varias divisiones mitóticas con el fin de obtener gran población celular, que luego ingresarán en el proceso meiótico para diferenciarse y convertirse en espermatozoides [25].

#### **3.1.2. Meiosis**

En la meiosis, las espermatogonias tipo B, las más maduras, se dividen para formar espermatocitos primarios. Durante la primera división meiótica, se da la profase I, metafase I, anafase I y telofase I [25].

La profase I está conformada por 4 etapas importantes: leptoteno, cigoteno, paquiteno y diacinesis. En la fase de leptoteno, los cromosomas de los espermatocitos primarios empiezan a condensarse formando filamentos largos. En el cigoteno, los cromosomas conforman pares con sus homólogos. Luego, en la fase del paquiteno los cromosomas se identifican como tétradas. El fin de la profase I, se da en la diacinesis, donde ocurre el entrecruzamiento de cromosomas

homólogos generando múltiples variaciones genéticas únicas de cada gameto [22].

En la metafase I, los cromosomas pares se empiezan a alinear en la placa ecuatorial; después, migran a los polos opuestos de las células, en el anafase I. Finalmente en la telofase I, las células hijas se separan y se mantiene el puente citoplasmático para formar 2 espermátocitos secundarios que comienzan la meiosis II [22]. En la etapa de la meiosis II o también llamada meiosis reduccional, se obtienen 2 células hijas (espermátides haploides). Conforme cada célula se va dividiendo para formar 2 células hijas, se conserva el puente citoplasmático entre ambas células, dicho puente logra que las células hijas recién formadas se mantengan unidas entre sí, dando como resultado un sincitio de células, que permite que las células se comuniquen entre sí.

### **3.1.3. Espermiogénesis**

La última fase de la espermatogénesis es la espermiogénesis, la cual consiste en la conversión de espermátidas a espermatozoides estructuralmente listos para fecundar al óvulo. Dichos cambios suceden cuando las espermátidas están enlazadas con el citoplasma de las células Sertoli. [23].

Esta fase se divide en 4 etapas: de Golgi, de cubierta, de acrosoma y de maduración. En estas etapas se empiezan a diferenciar las partes estructurales del espermatozoide, comenzando por la cabeza, el acrosoma, el cuello y la cola [24,25].

Asimismo, durante esta fase, las espermátides se deshacen de mayor parte de su citoplasma y se recomponen sus organelos para formar flagelos y convertirse en espermatozoides. Lo sorprendente de este proceso es que no se necesita de ninguna división celular para que se complete. En la rata, el ciclo espermatogénico tarda aproximadamente entre tres semanas a 35 días en completarse [25].

### **3.2. Ciclo del epitelio seminífero**

El ciclo seminífero en las ratas se cataloga en 14 estadios denominados con números romanos del I al XIV. Estos estadios se dan a medida que las células germinales o espermatogonias se distinguen y se movilizan gradualmente hacia el lumen o la luz del túbulo seminífero. Asimismo, según la literatura, la duración

del ciclo del epitelio seminífero en las ratas es de 12.5 a 13 días; por lo que, una espermatogonia requiere de relativamente 5 ciclos (65 días) para convertirse en espermatozoide y ser liberado a la luz del túbulo [26].

### **3.2.1 Estadios del ciclo seminífero en la rata**

En la etapa o estadio I se observan espermatogonias del tipo A4, las cuales se caracterizan por su núcleo en forma de ovoide y suelen almacenar más cromatina en la membrana nuclear. Además, en este estadio también se pueden presentar espermátidas. En los estadios II y III, se encuentran espermatocitos en paquiteno y espermátidas. En los estadios II y III, se encuentran espermatogonias A1 y espermatogonias intermedias, espermátidas y espermátidas. En estadios IV y V, también están presentes espermatogonias A1, Intermedias y tipo B, espermátidas y espermátidas. En el estadio VI, se encuentran las espermatogonias A1, B y, además, los espermátidas preplatónicos, con cromosomas delgados. En el caso de los estadios VII y VIII se suelen observar espermátidas en leptoteno, caracterizados por tener un núcleo más grande, asimismo, en esta etapa ocurre la espermiación (liberación de los espermátidas hacia el túbulo seminífero). En el estadio IX, se logran analizar espermatogonias A1, espermátidas en leptoteno y paquiteno, y espermátidas. Desde el estadio X al XII, permanecen las espermatogonias tipo A2, espermátidas en leptoteno y cigoto. Por otra parte, en el estadio XIII, están presentes las espermatogonias A3 y espermátidas en cigoto y diacinesis. Por último, en el estadio XIV, se encuentran los espermátidas en paquiteno, espermátidas secundarios y espermátidas [26].

## **3.3. Histología del túbulo seminífero**

### **3.3.1. Células de Sertoli**

Las células de Sertoli son células cilíndricas que engloban a un conjunto de células espermatogénicas. El núcleo es de forma ovalada localizado hacia la zona basal de la célula, en el caso de las ratas, la posición y la forma del núcleo cambia según la etapa del ciclo espermatogénico [22, 27, 28].

Una de las funciones de las células de Sertoli es que dan el soporte nutricional y fisiológico a las células germinales en desarrollo. Además, genera un medio rico en fructosa que fortalece y permite el transporte de los espermatozoides hacia los conductos genitales; también, realiza la síntesis y secreción de hormonas importantes para el buen desarrollo de la espermatogénesis. Por otro lado, las células de Sertoli unidas a las células de Sertoli adyacentes forman una barrera hematotesticular, que principalmente se encarga de proteger a los espermatozoides en formación de posibles agentes dañinos. Además, impide las reacciones autoinmunes contra las células germinales [28].

### **3.3.2. Espermatogonias**

Las espermatogonias son células germinales pequeñas y diploides ubicadas principalmente cerca a la membrana basal del túbulo seminífero. Estas células se diferencian en seis tipos: A1, A2, A3, A4, Intermedias, B. Las espermatogonias germinales pasan por diferentes divisiones mitóticas para formar espermatogonias tipo B, que se distinguen de las de tipo A porque el tamaño nuclear es menor y la cromatina se hace más gruesa [22,28].

### **3.3.3. Espermatocitos**

Las espermatogonias tipo B por divisiones mitóticas se convierten en espermatocitos primarios. Estos espermatocitos se trasladan desde el compartimiento basal al comportamiento luminal, uniéndose con las células Sertoli, con el fin de sostener la integridad de la barrera hematotesticular. Asimismo, primero entran en la etapa de la meiosis I, donde duplican su material genético, estos espermatocitos suelen tener el núcleo más grande y son las células más grandes del epitelio seminífero. Después se da la meiosis II, en la cual se genera una disminución en la cantidad de cromosomas y del contenido de ADN, formando espermatidas [22].

### **3.3.4. Espermatidas**

Las espermatidas son células pequeñas haploides que están cerca de la luz del túbulo seminífero. Tienen como característica un abundante retículo endoplasmático rugoso, varias mitocondrias y el aparato de Golgi desarrollado.

Asimismo, en el proceso de la espermiogénesis, estas células van desechando gran parte de su citoplasma, reorganizan sus organelos y forman un flagelo para convertirse en espermatozoides. La espermiogénesis se subdivide en 4 fases importantes: Fase de Golgi, fase de cubierta, fase de acrosómica y fase de maduración [22,27].

### **3.3.5. Espermatozoides**

Los espermatozoides son células alargadas y están compuestos por una cabeza con núcleo, un cuello y una cola. En la cabeza se encuentra el núcleo condensado, además, se ubica el acrosoma, el cual rodea al núcleo. El cuello contiene un centriolo proximal que está recubierto por citoplasma residual. En el caso de la cola, esta le permite la movilidad y representa la mayor parte de su longitud. Y se divide en pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal [22,27].

## **4. Órganos reproductivos masculinos**

### **4.1. Testículo**

Los testículos son órganos que producen espermatozoides y testosterona. En las ratas macho adultas, el peso del testículo se encuentra entre 2 a 3.5 g, y tiene un tamaño de aproximadamente 20 mm.

Asimismo, en el testículo se encuentran alrededor de 1000 mm de túbulos seminíferos, en donde ocurre la espermatogénesis. Estos túbulos son huecos contorneados de 32 cm de longitud, que se compone de epitelio seminífero grueso, el cual a su vez está rodeado por un tejido conjuntivo delgado (túnica propia). El epitelio seminífero se compone de células de Sertoli y espermatogonias en distintas etapas de maduración [27]

### **4.2. Epidídimo**

El epidídimo es un tubo muy contorneado que se encuentra en la superficie posterior del testículo. Se divide en 3 partes: cabeza, cuerpo y cola del epidídimo. La cabeza está conformada por la unión de 10 a 20 conductillos eferentes (túbulos que llevan a los espermatozoides desde la *rete testis* hacia el epidídimo). Y la cola cumple la función de almacenar los espermatozoides [27].

### **4.3. Conducto deferente**

El conducto deferente es un tubo muscular que cumple la función de movilizar los espermatozoides desde la cola del epidídimo hacia el conducto eyaculador. Se divide en: conducto deferente delgado (CDD) y conducto deferente grueso (CDG) [27].

### **5. *Lepidium Meyenii*:**

La maca es una planta de la familia Brassicaceae que se cultiva en los Andes centrales del Perú a altitudes entre 3800 a 4500 msnm [29]. Durante los últimos años, investigadores han tenido gran interés por estudiar esta planta, ya que posee diferentes propiedades y efectos positivos para la salud humana [29].

En el Perú, existen distintas variedades de maca que difieren por el color, y a su vez por sus propiedades biológicas [30]. Actualmente, las más conocidas y estudiadas son la maca amarilla, maca roja y maca negra. La maca amarilla, tiene mayor función energizante y estimulante [31]. La maca roja mejora la calidad embrionaria, disminuye síntomas de menopausia y reduce el tamaño de la próstata, entre otros [31]. Por otro lado, la maca negra, es la variedad con más investigaciones que avalan sus propiedades dentro de la salud reproductiva masculina. Según estudios, desde hace varios años, la raíz o el hipocótilo de la maca negra se ha aprovechado para incrementar la fertilidad gracias a su mayor contenido de sacarosa y fitoquímicos [32].

A su vez, se conoce por diversos estudios que la maca negra genera múltiples efectos positivos en la salud reproductiva en comparación con otros tipos de maca, ya que los metabolitos del extracto metanólico de la maca negra y la maca amarilla en ratones adultos machos, halló que el extracto de maca negra tuvo un mejor efecto sobre el conteo de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente comparado con el extracto de maca amarilla [33]. También, otros estudios experimentales mencionan que los extractos de maca negra en contraste con la maca amarilla y roja, muestran mayor efecto en el aumento de la espermiación (liberación del espermatozoide hacia la luz del túbulo seminífero), el volumen seminal, y el conteo y la movilidad de espermatozoides [5].

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El plomo es un metal abundante en la corteza terrestre y ampliamente distribuido por el humano producto del proceso de industrialización. Se estima que la media agrupada de Pb sérico en adultos de países de ingresos bajos y medio varía entre 0,39 a 11,36  $\mu\text{g}/\text{dL}$  [34]; en adición, la OMS ha estimado que la exposición a Pb representó alrededor de un millón de muertes y 21.7 millones de años de vida ajustados por discapacidad en el 2021 [35]. El Pb afecta a múltiples sistemas corporales; en relación a ello, diversos estudios reportan diferentes efectos negativos en el sistema reproductivo masculino como la disminución del deseo sexual, daño cromosómico, cambios en los niveles de testosterona, función anormal de la próstata y alteración de la espermatogénesis [5, 36]. Siguiendo la línea anterior, en un estudio en trabajadores de talleres de baterías, se determinó que el 58% de los individuos evaluados presentaron niveles muy altos de plomo en sangre, de estos el 27.3% tuvo alteraciones en la calidad seminal como la reducción de espermatozoides móviles [37]. Asimismo, en Perú, un estudio evaluó la calidad del semen y la exposición a Pb en policías de tránsito de la ciudad de Arequipa, y se reportó una correlación inversa entre la concentración de Pb sérico y parámetros de calidad del semen [38].

A estos antecedentes se suman estudios realizados en modelos de animales, que señalan que el tratamiento con acetato de plomo afecta gravemente la espermatogénesis, la función testicular y el peso de los órganos reproductivos. Estudios realizados en ratas macho Wistar demostraron que, la administración de una solución acuosa con 2500 ppm de plomo administrado *ad libitum* redujo significativamente la motilidad y recuento de espermatozoides, así como un aumento significativo del porcentaje de mortalidad, lentitud y anormalidad de espermatozoides en epidídimo [39]. Otro estudio, reportó que la administración de 20 mg/kg de acetato de plomo, por vía oral en ratas albinas, produjo alteraciones histopatológicas en los testículos [40]. En general, se llega a la conclusión que el Pb afecta negativamente la espermatogénesis y, por ende, se considera una causa de infertilidad disminuyendo la tasa de embarazos exitosos.

Siguiendo el párrafo anterior, la infertilidad es un problema de salud pública que afecta al 8 a 12% de las parejas en edad reproductiva. Se estima que el 20 a 30% de la infertilidad se atribuye al hombre, del cual una de las causas más comunes es el estrés oxidativo que afecta a 37 millones de hombres con infertilidad en el mundo [6, 41]. El estrés oxidativo

puede ser causado por diferentes factores, entre los cuales, se destaca la exposición de tóxicos ambientales; siendo el plomo uno de los más ampliamente distribuido en el ambiente. De acuerdo a los estudios, los resultados de la exposición a plomo en población general y ocupacional expuesta, mostraron correlaciones negativas entre la concentración de Pb sérico y enzimas antioxidantes, así como correlaciones positivas entre el Pb y un marcador de estrés oxidativo, siendo el más empleado el malonaldehído (MDA) [9].

Por otra parte, se ha demostrado que la maca revierte el daño producido por el plomo en la función reproductiva masculina, diversos estudios experimentales han revelado que la maca negra tiene efectos sobre la función testicular incrementando el recuento de espermatozoides en testículo, epidídimo y conducto deferente. En adición, según lo revisado, la maca comparada con otros alimentos ricos en antioxidantes tiene un mayor efecto protector en la producción de espermatozoides [42]. Asimismo, en modelos de infertilidad inducida por estrés oxidativo, se evidenció que la maca negra previene el daño provocado por agentes oxidantes, expresado en la recuperación de la concentración de enzimas antioxidantes a valores basales y mejora en la progresión de la espermatogénesis [12,13].

Por todo lo mencionado anteriormente, la maca negra tiene un rol importante en la espermatogénesis, dando como resultado posibles líneas terapéuticas para la infertilidad masculina relacionadas con la exposición al plomo; sin embargo, actualmente se desconoce los mecanismos fisiológicos y moleculares que expliquen si la maca negra ejerce un efecto protector, sobre el proceso de espermatogénesis, en un modelo de estrés oxidativo inducido por acetato de plomo, ya que estudios anteriores, solo han determinado que el tratamiento con maca previene o revierte el daño provocado en la espermatogénesis, por la administración de acetato de plomo, mas no sus mecanismos de acción. Por esta razón, la presente investigación pretende evaluar el efecto antioxidante de la maca negra sobre el estrés oxidativo ocasionado por el plomo, evaluando estos efectos en órganos primarios de la reproducción masculina tales como testículos y epidídimos. Los resultados de esta investigación, contribuirán a dilucidar los efectos dañinos ocasionados por el plomo en la reproducción masculina, y a su vez contribuirían también esclarecer los mecanismos de acción por el cual la maca protege el efecto tóxico producido por el plomo.

### **III. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿La maca negra protege de la toxicidad del acetato de plomo a través de un mecanismo antioxidante en los órganos reproductivos masculinos de un modelo de rata de la cepa Sprague-Dawley?

### **IV. HIPÓTESIS**

La maca negra protege de la toxicidad del acetato de plomo en los órganos reproductivos masculinos de un modelo de rata de la cepa Sprague-Dawley al disminuir el estrés oxidativo.

### **V. OBJETIVOS**

#### **- Objetivo general**

Determinar si la acción antioxidante del extracto acuoso de maca negra protege la disminución de la espermatogénesis inducida por exposición al acetato de plomo en ratas adultas.

#### **- Objetivos específicos**

- Determinar el efecto toxicológico del acetato de plomo en la espermatogénesis de ratas macho adultas.
- Cuantificar el grado de estrés oxidativo inducido por acetato de plomo en los órganos reproductivos masculinos de ratas macho adultas.
- Determinar el efecto del tratamiento con la maca negra sobre el estrés oxidativo inducido por acetato de plomo en testículos, epidídimos y conducto deferente de ratas macho adultas.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### a) Animales de experimentación

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley con 3 meses de edad y un peso promedio de 300 g, obtenidos del bioterio central de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Las ratas se mantuvieron en condiciones estándares de humedad (80-85%), temperatura (20-22 °C) y con un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 h. La alimentación se realizó con comida estándar del laboratorio Purina y agua *ad libitum* [15]. Los animales experimentales se agruparon en jaulas, de manera aleatoria en 6 grupos (Control, Plomo 8, Plomo 16, MN+Plomo 8, MN+Plomo 16, MN), 6 animales por grupo. El tiempo de adaptación de los animales fue de 7 días. Luego se inició con la administración de acetato de plomo y maca negra por 35 días. El día 36, todas las ratas fueron sacrificadas. El procedimiento de la eutanasia y necropsia se realizó en el Laboratorio de Endocrinología y Reproducción de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por personal capacitado.

### b) Preparación del extracto acuoso de maca negra

En este estudio se emplearon extractos hidroalcohólicos atomizados de maca negra en sachets de 3g marca Juvens. Se preparó un stock de 60 ml de extracto acuoso de maca negra, diluyendo un sachet completo de extracto atomizado de maca negra en 60 ml de agua destilada, la concentración resultante es de 50 mg/ml. El extracto de maca negra se administró diariamente por vía oral (1 ml) mediante sonda orogástrica #18 a una dosis única de 50 mg por día [15].

**Tabla 1. Información Nutricional de la Maca Negra marca Juvens.**

<b>INFORMACIÓN NUTRICIONAL → 3 gramos</b>	
<b>Calorías</b>	10 kcal
<b>Carbohidratos totales</b>	2 g
<b>Fibra</b>	0.01-0.05 g
<b>Proteína</b>	0.3-0.4 g
<b>Grasa total</b>	0.01 g
<b>Vitamina C</b>	0.33-0.45 mg
<b>Calcio</b>	0.006 mg
<b>Hierro</b>	0.015-0.03 mg
<b>Sodio</b>	5-11 mg
<b>Potasio</b>	45-55 mg

Fuente: Contenido del sachet marca Juvens.

c) Alteración de la espermatogénesis por tratamiento con acetato de plomo

Los animales fueron inducidos a estrés oxidativo a través de inyecciones intraperitoneales de acetato de plomo a dosis de 8 y 16 mg/kg de peso corporal durante 35 días, ya que se ha demostrado en un estudio previo, el efecto deletéreo a la dosis mencionadas [15].

d) Modelo experimental

Para evaluar el objetivo del presente proyecto se formaron los siguientes 6 grupos. Cada grupo de experimentación incluyó 6 ratas (N=36):

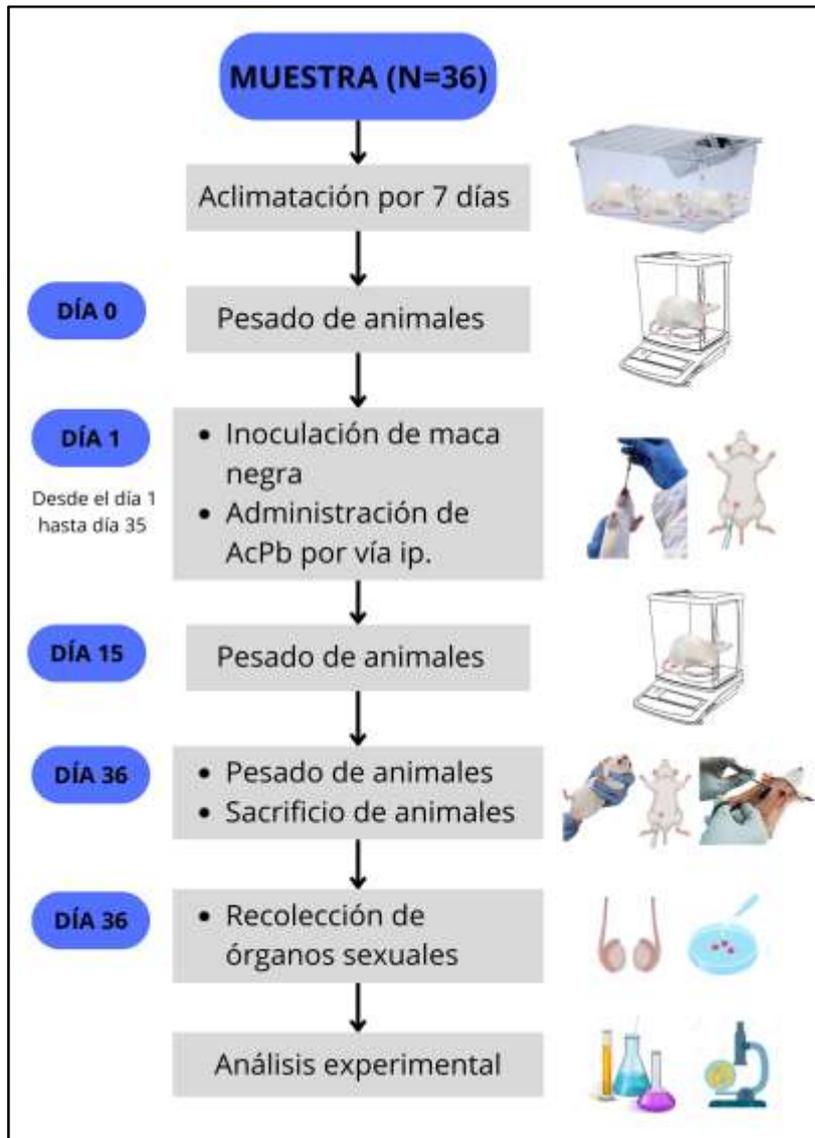
**Tabla 2. Organización de los grupos experimentales y tratamiento dado.**

<b>GRUPOS</b>	<b>TRATAMIENTO</b>
Grupo Control	Acetato de sodio vía intraperitoneal; vía oral agua destilada (1 ml/día)
Pb 8	8 mg de acetato de Pb/ kg de peso corporal vía ip. (intraperitoneal), vía oral agua destilada (1 ml/día)
Pb 16	16 mg de acetato de Pb/kg de peso corporal vía ip., vía oral agua destilada (1 ml/día)
MN + Pb 8	8 mg de acetato de Pb/kg de peso corporal vía ip. + 1 ml de extracto acuoso de maca negra por V.O (50 mg/d)
MN + Pb 16	6 mg de acetato de Pb/kg de peso corporal vía ip. + 1 ml de extracto acuoso de maca negra por V.O (50 mg/d)
MN	Acetato de sodio vía ip.; 1 ml de extracto acuoso de maca negra por V.O (50 mg/d)

Fuente: Elaboración propia

El grupo Control recibió acetato de sodio por vía intraperitoneal y agua destilada por vía oral por 35 días. A los grupos Plomo 8 y Plomo 16, se les inyectó 8 y 16 mg/kg, respectivamente, de acetato de plomo desde el día 1 al día 35. En el caso de los grupos MN+Plomo 8 y MN+Plomo 16 recibieron acetato de plomo 8 y 16 mg/kg, respectivamente, más 1 ml de extracto acuoso de maca negra por vía oral. Por último, el grupo MN recibió 1 ml de extracto acuoso de maca negra durante 35 días.

Este estudio tiene como objetivo evaluar el efecto protector de la maca negra frente al estrés oxidativo provocado por la administración de acetato de plomo. Por esta razón, se les administró maca negra a las ratas, desde un inicio. Como cada ciclo espermatogénico dura aproximadamente 12 días, se estuvo observando el efecto durante 3 ciclos espermatogénicos (+/- 36 días).



**Figura 1.** Flujograma experimental

e) Tamaño de muestra

De acuerdo Cohen J, se utilizó el tamaño de muestra de diferencia de medias independientes (tamaño de muestra para ANOVA) para múltiples grupos [43], se tendrá en cuenta los valores del estudio de Surdajawo S y colaboradores [44], en el cual, a las ratas se les induce estrés oxidativo y luego se les da un tratamiento con una planta medicinal (utilizan 5 grupos). Para la desviación estándar se tomó el valor de 3.08 y una diferencia relevante en los niveles de MDA en el testículo al inicio y final del tratamiento de 7 nM de MDA/g de testículo.

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_0)^2} * \left(1 + \frac{k - 1}{2}\right)$$

Donde:

- $\sigma$  = Desviación estándar (3.08)
- $Z_{\alpha}$  = 1,96 (nivel de confianza del 95%)
- $Z_{\beta}$  = 0,84 (poder estadístico 80%)
- $\mu_1 - \mu_0$  = diferencia en la media de MDA entre el grupo con estrés oxidativo y estrés oxidativo más tratamiento (32.5 - 25.5 = 7 nM/gr de tejido)
- $k$  = número de grupos de tratamiento

De la ecuación, se obtuvo un valor de 5 ratas por grupo. Se consideró el 15% de proporción esperada de pérdidas, obteniendo una n de 6 animales experimentales por grupo. Nuestro estudio tiene 6 grupos, por lo que el tamaño de muestra total es de 36 ratas experimentales.

Para evaluar la potencia de la muestra se utilizó un comando en Stata 18 (Anexo 2). Se obtuvo una potencia del 90%.

f) Variables

**Tabla 3. Operacionalización de variables**

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Instrumento
Delta del peso corporal	Peso final – peso inicial	Peso final en gramos – peso inicial en gramos del animal experimental	Dependiente Cuantitativa	Continua Escala: Razón	Balanza Analítica
Peso de testículo	Peso del testículo del animal	Peso en gramos del testículo izquierdo y derecho del animal	Dependiente Cuantitativa	Continua Escala: Razón	Balanza Analítica
Peso de epidídimo	Peso del epidídimo del animal	Peso en gramos del epidídimo izquierdo y derecho del animal	Dependiente Cuantitativa	Continua Escala: Razón	Balanza Analítica
Concentración de malondialdehído	El malonaldehído es considerado y utilizado como un biomarcador del estrés oxidativo, producto final de la peroxidación lipídica.	Concentración MDA cuantificado mediante ensayo de TBARS en homogeneizado de un testículo.	Dependiente Cuantitativa	Continua Escala: Razón	Ensayo TBARS
Conteo de espermatozoides en epidídimo	Células reproductivas masculinas que se encuentran en el epidídimo.	Número de espermatozoides en un epidídimo.	Dependiente Cuantitativa	Continua Escala: Razón	Cámara de Neubauer
Conteo de espermatozoides en conducto deferente	Células reproductivas masculinas que se encuentran en el conducto deferente.	Número de espermatozoides en el conducto deferente.	Dependiente Cuantitativa	Continua Escala: Razón	Cámara de Neubauer

Grosor del epitelio	Espesor de las células germinales del túbulo seminífero del testículo	Promedio de la capa de células germinales del túbulo seminífero	Dependiente Cuantitativa	Continua Escala: Razón	Microscopio óptico (Nikon Eclipse E-200)
Histopatología en el tejido testicular	Histología de túbulos seminíferos del testículo	Diferencias histológicas en la arquitectura testicular	Dependiente Cualitativa	Nominal	Cortes histológicos, Microscopio óptico (Nikon Eclipse E-200)
Histopatología en el tejido epididimario	Histología de túbulos seminíferos del testículo	Diferencias histológicas en el epidídimo	Dependiente Cualitativa	Nominal	Cortes histológicos. Microscopio óptico (Nikon Eclipse E-200)

g) Recolección de órganos sexuales.

Al sacrificar a los animales experimentales se les inyectó una sobredosis de Halatal, luego se separaron los órganos sexuales: epidídimo, conducto deferente y testículos, tanto derecho como izquierdo, en solución salina. Después se pesaron en una balanza analítica SERIE 0000112, para luego usar los órganos en los siguientes experimentos: conteo de espermatozoides, cortes histológicos, grosor de túbulos seminíferos y evaluación de MDA. Se utilizó el epidídimo y conducto deferente derecho para el conteo espermático. El testículo y epidídimo izquierdo para la evaluación de cortes histológicos, además se utilizaron los cortes histológicos del testículo izquierdo para el cálculo del grosor del túbulo seminífero. Y se usó el testículo derecho para el ensayo de TBARS.

h) Evaluación del conteo espermático en epidídimo y conducto deferente

**Conteo espermático en epidídimo:**

Se cortó la cabeza del epidídimo y el cuerpo del epidídimo y se homogeneizaron por separado la cola del epidídimo, este proceso se realizó en 5 ml de solución salina (NaCl al 0,9%). Los homogenizados se mantuvieron refrigerados a 4°C por 24 h para permitir que los espermatozoides se liberen en la solución, después se le añadió 5 ml de eosina al 2% y se agitó en vortex. Luego, 1 ml de la mezcla se disolvió con 2 ml de eosina al 2% y se colocó 10  $\mu$ l de esta solución en una cámara de Neubauer. Los espermatozoides resistentes a la homogeneización fueron contabilizados en 25 cuadrados de la cámara en cuatro tiempos. Los resultados del recuento medio de los espermatozoides de cada rata se multiplicaron por 0.06 (espermatozoides  $\times 10^6$ / ml) y luego por 5 ml (espermatozoides  $\times 10^6$ /epidídimo) [45,46].

**Conteo espermático en conducto deferente:**

El conducto o vaso deferente fue seccionado en 2 partes (extremo proximal y distal), luego se le añadió a cada parte 1 ml de solución salina para homogeneizarlos. Luego, se agregó 2 ml de eosina (2%) a la placa Petri, con ayuda de una pipeta Pasteur se mezcló bien la solución. Después, con una micropipeta

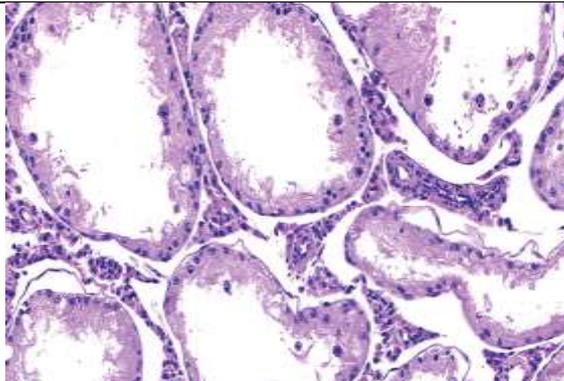
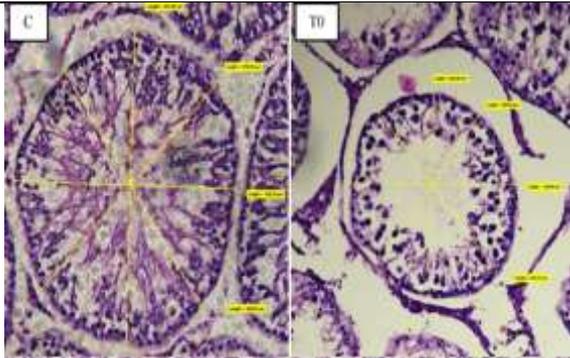
se obtienen 10 ul para verterlos en cada lado de la cámara de Neubauer. Los espermatozoides se contaron en los 25 cuadrados de las retículas de la cámara de Neubauer. Se midieron cuatro veces y se promediaron. Los resultados de cada parte (proximal y distal) se multiplicaron por 0.03 (espermatozoides x  $10^6/\square\square$ ) y se expresaron como cantidad total de espermatozoides en conducto deferente (recuento de espermatozoides en extremo proximal + recuento de espermatozoides en extremo distal) [47].

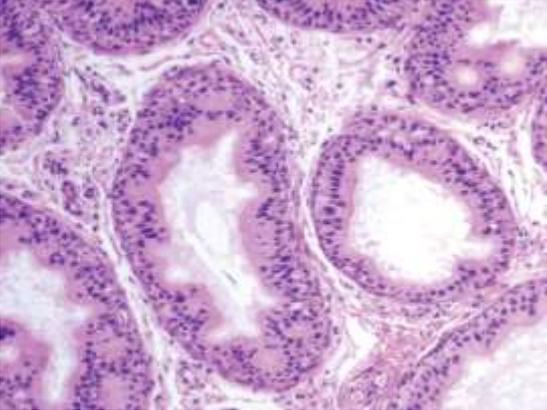
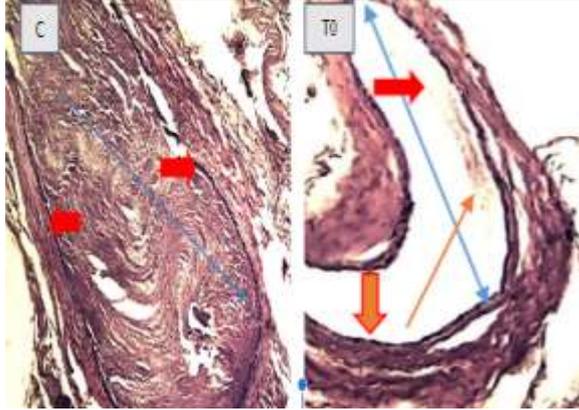
i) Evaluación de histología por medio de cortes histológicos

Después de sacrificar a los animales, se separó el testículo izquierdo y el epidídimo izquierdo. Luego, se pesaron en una balanza analítica, y fue puesto en una solución de formaldehído al 10%. Posteriormente se realizaron cortes transversales ecuatoriales del testículo y epidídimo con un espesor de 5  $\mu$ m, y teñidos con la técnica de ácido peryódico - Schiff y Hematoxilina, finalmente fueron observados en el microscopio óptico Nikon Eclipse E-200, con aumento de 100X [46].

Al analizar la histopatología en los órganos reproductivos (testículo y epidídimo), se analizó el daño celular, principalmente se observó en el testículo las siguientes características: 1) Espermatogénesis incompleta/ atrofia tubular y 2) Encogimiento de túbulos seminíferos. En el caso del epidídimo: 3) Daño en el epitelio. y 4) disminución espermática. (Tabla 4)

**Tabla 4. Histología del túbulo seminífero y epidídimo afectados por acetato de plomo**

1) Espermatogénesis incompleta / Atrofia tubular	2) Encogimiento de túbulos seminíferos
 <p data-bbox="256 1980 820 2031">Figura A. Atrofia Tubular en testículo de rata por toxicidad. Fuente: Dianne C, et. col. 2012. [48]</p>	 <p data-bbox="852 1957 1422 2031">Figura B. Encogimiento de túbulos seminíferos. Grupo Control (C) vs Grupo AcPb(T0) Fuente: Suwaibatul A, et col. 2023. [49]</p>

3) Daño en el epitelio (cambio cribiforme)	4) Disminución espermática
 <p data-bbox="256 674 826 734">Figura C. Cambio cribiforme en epidídimo de rata por toxicidad. Fuente: Dianne C, et. col. 2012. [48]</p>	 <p data-bbox="847 674 1431 757">Figura D. Disminución espermática. Grupo Control (C) vs Grupo AcPb(T0) Fuente: Zahraa KADHIM, et col. 2022. [50]</p>

- j) Cálculo del grosor de los túbulos seminíferos en testículo por medio de cortes histológicos.

Se escogió al azar los cortes histológicos y se observó cinco campos de visión, por cada grupo, a través del microscopio óptico (Nikon Eclipse E-200) con un aumento de 100X. Posteriormente, mediante el programa TopViewer, se tomaron ocho rectas equidistantes de tal manera que cubrieran todo el epitelio seminífero. Luego, los ocho valores obtenidos por cada tubo seminífero se promedian dando como resultado el grosor de un tubo seminífero, se repitió el procedimiento descrito cinco veces por cada grupo de investigación; todo el procesamiento de los datos se realizó en Excel.

- k) Evaluación del estrés oxidativo en testículo

#### Ensayo de TBARS

El estrés oxidativo se midió con el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) el cual cuantifica la concentración malondialdehído (MDA), producto principal de la lipoperoxidación. El ácido tiobarbitúrico (TBA) forma un aducto 1:2 con el MDA, dicha reacción produce un color rosa-rojizo cuantificable a través de espectrofotometría [51]. El procedimiento se llevó a cabo según se indica en la literatura [52]. Después del sacrificio, se extrajo el testículo derecho de las ratas y se lavó con solución salina para eliminar cualquier resto.

Posteriormente, se homogeneizaron las muestras con buffer fosfato frío durante 3 min para obtener un homogenizado al 10%; el cual fue centrifugado a 6000 g por 10 min. Luego, se extrajo 0.5 ml de homogeneizado y se añadió 2.5 ml de ácido tricloroacético (100 g/L) en un tubo de ensayo que posteriormente se centrifugó y se puso en baño maría durante 15 min; seguidamente, se enfrió con agua temperada y fue centrifugado a 1000 g por 10 min. Se recogió 2 ml de sobrenadante y se añadió 1 ml de solución TBA (6.7 g/dl) en un tubo de ensayo y se calentó en baño maría con agua hirviendo durante 15 min. Finalmente, la solución se enfrió y se midió la absorbancia a 532 nm. La concentración de TBARS se calculó mediante el coeficiente de absorbancia del complejo MDA-TBA y expresado en nanomoles por gramo de proteína.

#### 1) Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico STATA (versión 18.0) para computadora personal (STATA Corporation, College Station, TX, EE. UU.). Los datos se presentaron como medianas  $\pm$  RIQ. La homogeneidad de las varianzas se evaluó mediante la prueba de Bartlett. Si las varianzas son homogéneas, las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre pares de medias se obtuvieron mediante la prueba de Bonferroni.

Si los datos no cumplen los supuestos de normalidad y homogeneidad (no paramétricas), las diferencias entre grupos se evaluaron mediante la prueba de Kruskal Wallis y la diferencias entre pares de grupo se evaluó con la prueba de Dunn Test.

Sin embargo, debido a la variabilidad de los datos, se optó por usar la prueba Kruskal Wallis y post hoc Dunn test en todas nuestras variables, y los datos fueron presentados en el Diagrama de Caja y Bigotes para mostrar dicha variabilidad.

Para las correlaciones entre la concentración de MDA y las variables (conteo de espermatozoides y grosor del epitelio seminífero), se utilizó la prueba de análisis de correlación de Spearman. Luego se realizó gráficos de dispersión.

Un valor de  $p < 0,05$  se considerará estadísticamente significativo.

m) Consideraciones éticas

Para iniciar el estudio, se consideró la aprobación del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, CONSTANCIA 016-04-23 (Anexo 6). El cuidado y manejo de los animales de experimentación se basó en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” (Consejo Nacional de Investigación, 1996).

Para la recolección de muestras, se sacrificó al animal para ello se realizó la eutanasia como medio para eliminar el dolor y estrés inducido al animal. En este procedimiento se aplicó pentobarbital sódico como anestésico con una dosis de 40 mg/kg de peso corporal, inmediatamente después se procedió con la eutanasia mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (dosis 200 mg/kg de peso corporal) [53]. Este procedimiento fue realizado por el asesor de tesis Dr. Manuel Gasco, profesional con más de 20 años de experiencia en el manejo de animales experimentales.

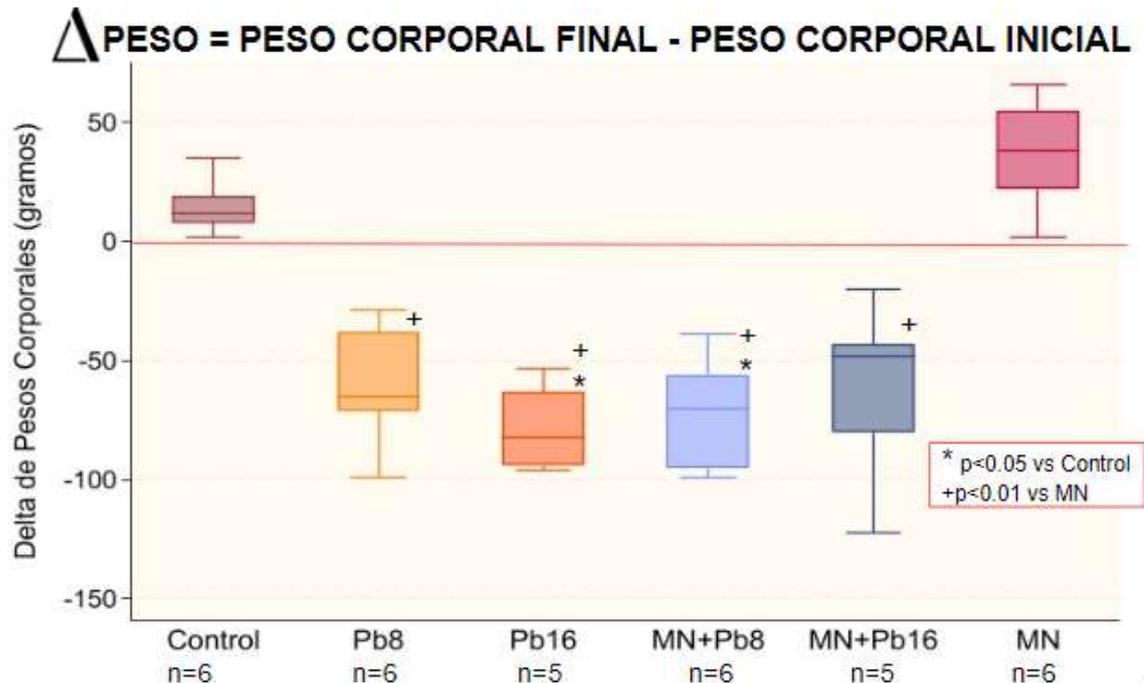
Con respecto a la necropsia (Anexo 7), este proceso se realizó en el Laboratorio de Endocrinología y Reproducción de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, exactamente en el área donde se realiza la extracción de órganos. Se extrajeron los testículos, epidídimos y vasos deferentes para el análisis experimental. El procedimiento fue realizado por los investigadores principales, previamente capacitados, y el asesor Dr. Manuel Gasco.

Los desechos biológicos se pusieron en bolsas rojas especiales para residuos biocontaminados, las cuales fueron desechadas en contenedores especiales para estos residuos, estos contenedores se encuentran ubicados en el área posterior del LID. Una empresa privada encargada y especializada en manejo de desechos tóxicos de la UPCH, se llevó todos los desechos contaminados para el proceso de eliminación de los mismos.

## VII. RESULTADOS

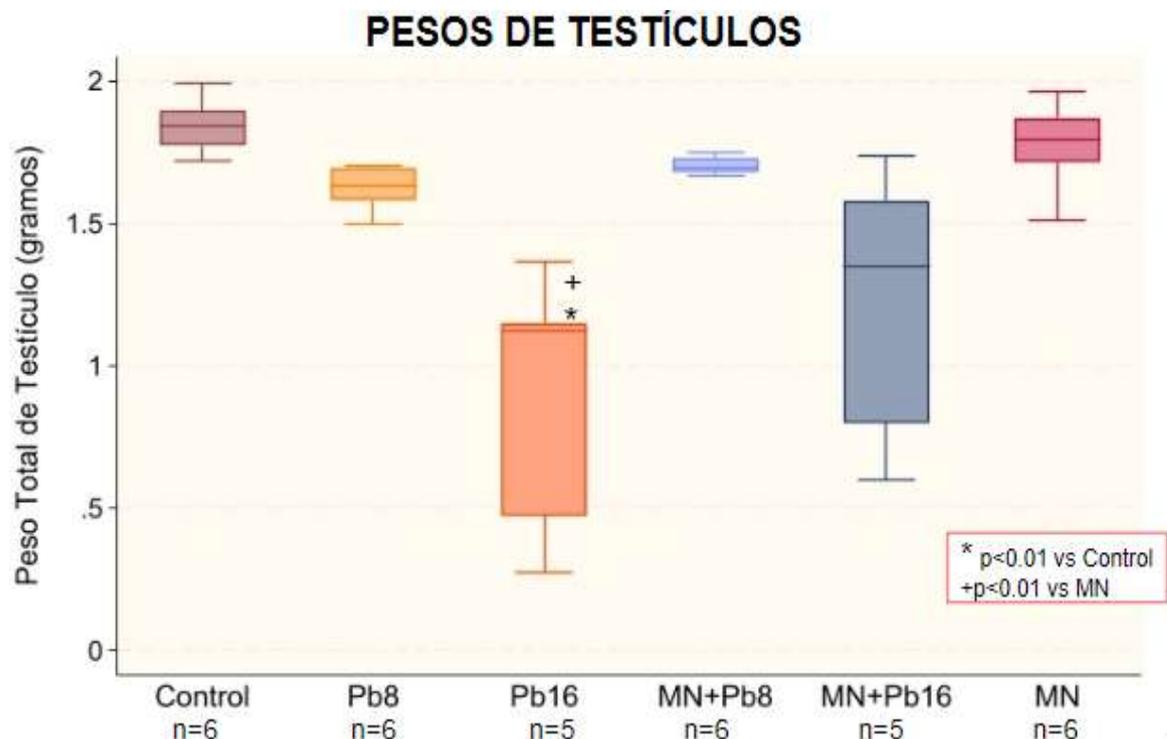
### PESOS CORPORALES Y DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTIVOS

En la Figura 2, en el gráfico de caja y bigotes, se observa el promedio del delta de pesos corporales por grupos (peso corporal final – peso corporal inicial). Además, debajo de la línea roja (resultados menores a 0), se encuentra una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del peso corporal en los grupos tratados con plomo (Pb 8 y Pb16) y los grupos tratados con plomo y maca (MN+Pb8 y MN+Pb16) en comparación con el control y ( $p < 0.01$ ) comparado con el grupo MN. Asimismo, este gráfico de caja de bigotes nos permite visualizar la distribución y variabilidad de los datos, una caja más grande y con bigotes más largos identifican una mayor dispersión en los datos. En este sentido, se visualiza que hay una mayor dispersión de datos en los grupos de Pb8 y MN+Pb16 con una clara asimetría negativa y positiva, respectivamente. Adicionalmente, destaca que el grupo Pb8 presenta el 50% de sus datos entre -35 y -75, en contraparte el grupo MN+Pb8 presenta el 50% de sus datos entre -50 y -90 pese a recibir el tratamiento con MN. Esto explicaría por qué el grupo de MN+Pb8 presenta una disminución significativa respecto al control pese a recibir MN.



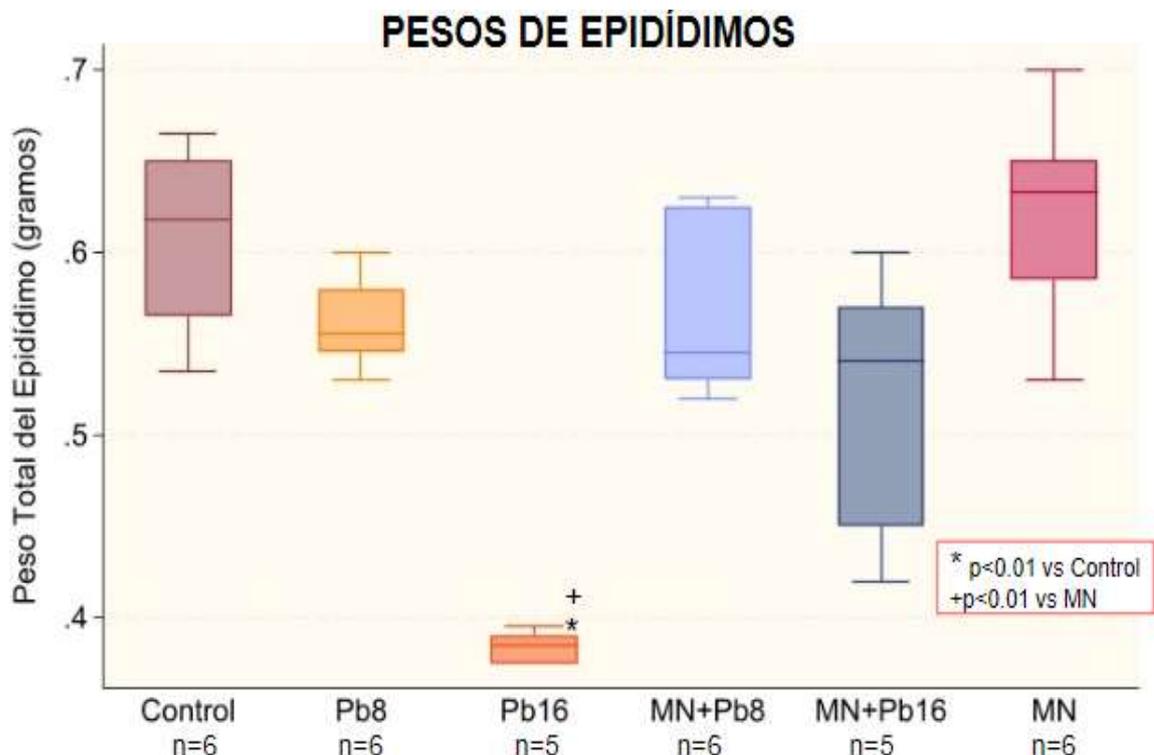
**Figura 2.** Delta de pesos corporales (peso corporal final – peso corporal inicial). Se muestra la disminución de los pesos corporales en los grupos con plomo (debajo de la línea roja). \* $p < 0.05$  mostro disminución significativa (Pb16, MN+Pb8) en comparación con el grupo Control; y + $p < 0.01$  los grupos (Pb8, Pb16, MN+Pb8, MN+Pb16) comparado con el grupo con maca (MN). Prueba estadística usada Kruskal Wallis – Dunn Test.

En adición, se extrajeron y pesaron los testículos y epidídimos de cada rata, el resumen se muestra en la figura 3 y 4 respectivamente. Con respecto al peso testicular, se observa una disminución del peso testicular en los grupos con Pb, pero solo los grupos con mayor concentración de Pb mostraron diferencias significativas en comparación con el grupo control y MN. Los grupos tratados con maca negra más ambas concentraciones de plomo (MN+Pb8 y MN+Pb16) no mostraron una disminución significativa respecto a los grupos tratados con solo plomo (Pb8 y Pb16) (Figura 3). Además, en la Figura 3, se observa una mayor dispersión de datos en los grupos Pb16 y MN+Pb16, sin embargo, la mediana del grupo Pb16 es menor que los demás grupos.



**Figura 3.** Pesos de testículos de ratas adultas después del tratamiento. Se muestra el promedio del peso en gramos del testículo total (testículo derecho + testículo izquierdo). La exposición a plomo mostró una disminución \* $p < 0.01$  en el peso de testículos entre el grupo Pb16 en comparación con el Control; y + $p < 0.01$  el grupo Pb16 con el grupo con maca (MN). Prueba estadística usada Kruskal Wallis – Dunn Test.

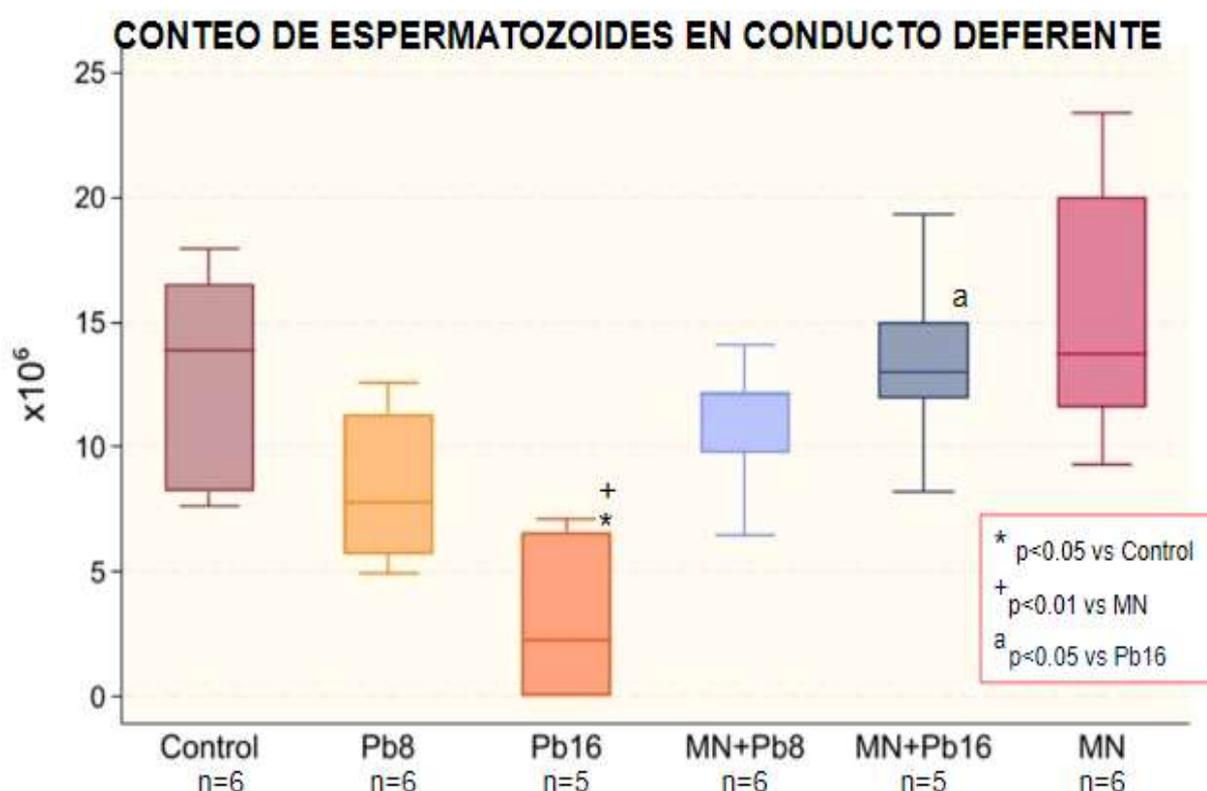
Estos resultados, se replican en los epidídimos, en donde se muestra una disminución significativa del peso del epidídimo en el grupo con mayor dosis de plomo (Pb16), de igual forma, el tratamiento con maca negra no mostró diferencias significativas respecto a los grupos tratados solo con plomo. Adicionalmente, se muestra una mayor asimetría en los datos en los grupos control, MN, MN+Pb16 y MN+Pb8 (figura 4).



**Figura 4.** Pesos de epidídimos de ratas adultas después de tratamiento. Se muestra el promedio del peso en gramos del epidídimo total (epidídimo derecho + epidídimo izquierdo). La exposición a plomo mostró una disminución  $*p < 0.01$  en el peso de epidídimo entre el grupo Pb16 en comparación con el Control; y  $+p < 0.01$  el grupo Pb16 con respecto al grupo con maca (MN). Prueba estadística usada Kruskal Wallis – Dunn Test.

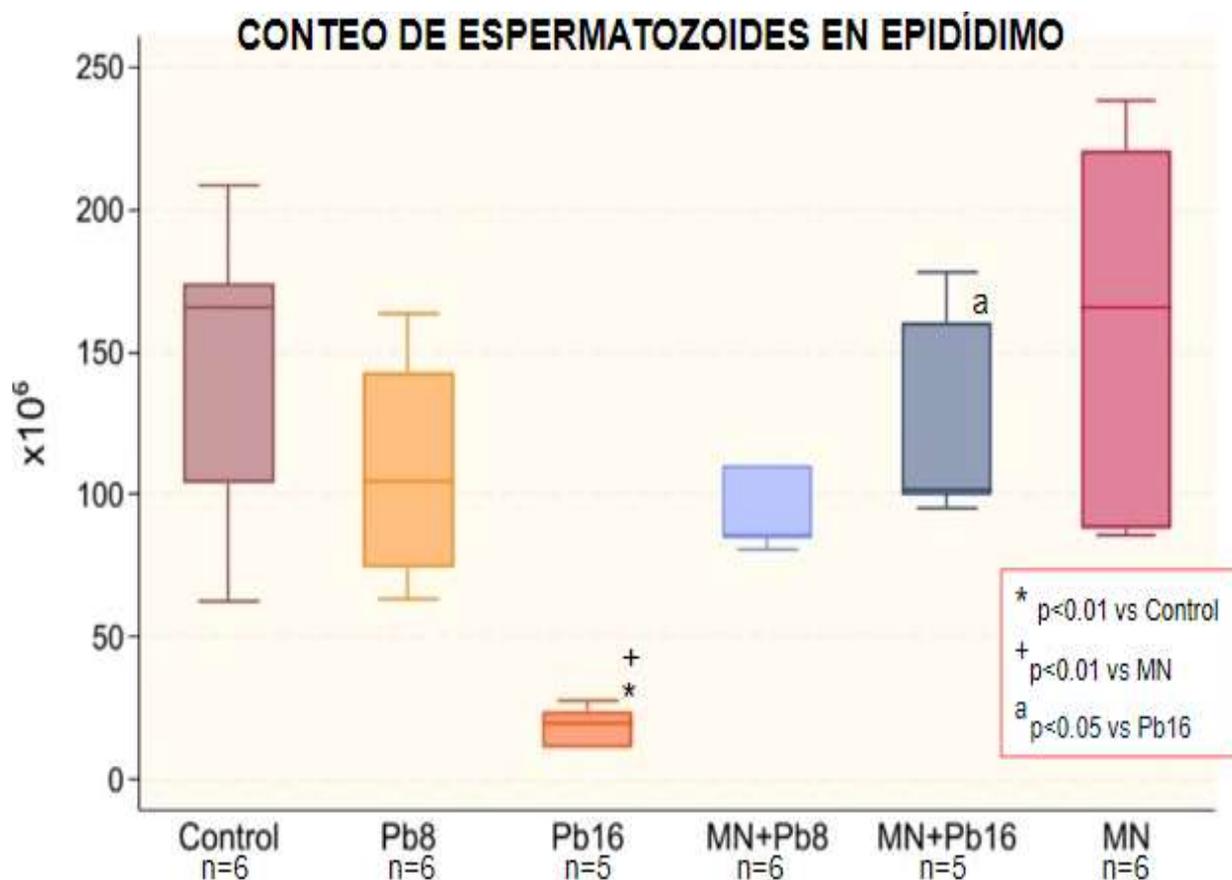
## CONTEO DE ESPERMATOZOIDES

El presente estudio evaluó el conteo de espermatozoides en conducto deferente y epidídimo como parte del efecto protector de la maca negra frente a la toxicidad inducida por el plomo. El conteo de espermatozoides en conducto deferente se redujo a partir de la administración de 8 mg/kg/día de Pb, no obstante, se encontró una disminución significativa en el grupo Pb 16 respecto al grupo Control y MN. Además, se encontró diferencias significativas en los grupos tratados con maca negra (MN) y Plomo 16 versus el grupo tratado con solo plomo 16. Destaca que los grupos tratados con MN+Pb a ambas dosis, presentan una menor dispersión comparado con los demás grupos.



**Figura 5.** Conteo de espermatozoides en conducto deferente de ratas adulto macho. La exposición a plomo mostró una disminución \* $p < 0.05$  Pb16 en comparación con el Control; y + $p < 0.01$  el grupo Pb16 comparado con el grupo con maca (MN). Además, se encontró un aumento <sup>a</sup> $p < 0.05$  entre el grupo MN+Pb16 comparado con Pb 16. Prueba estadística usada Kruskal Wallis – Dunn Test.

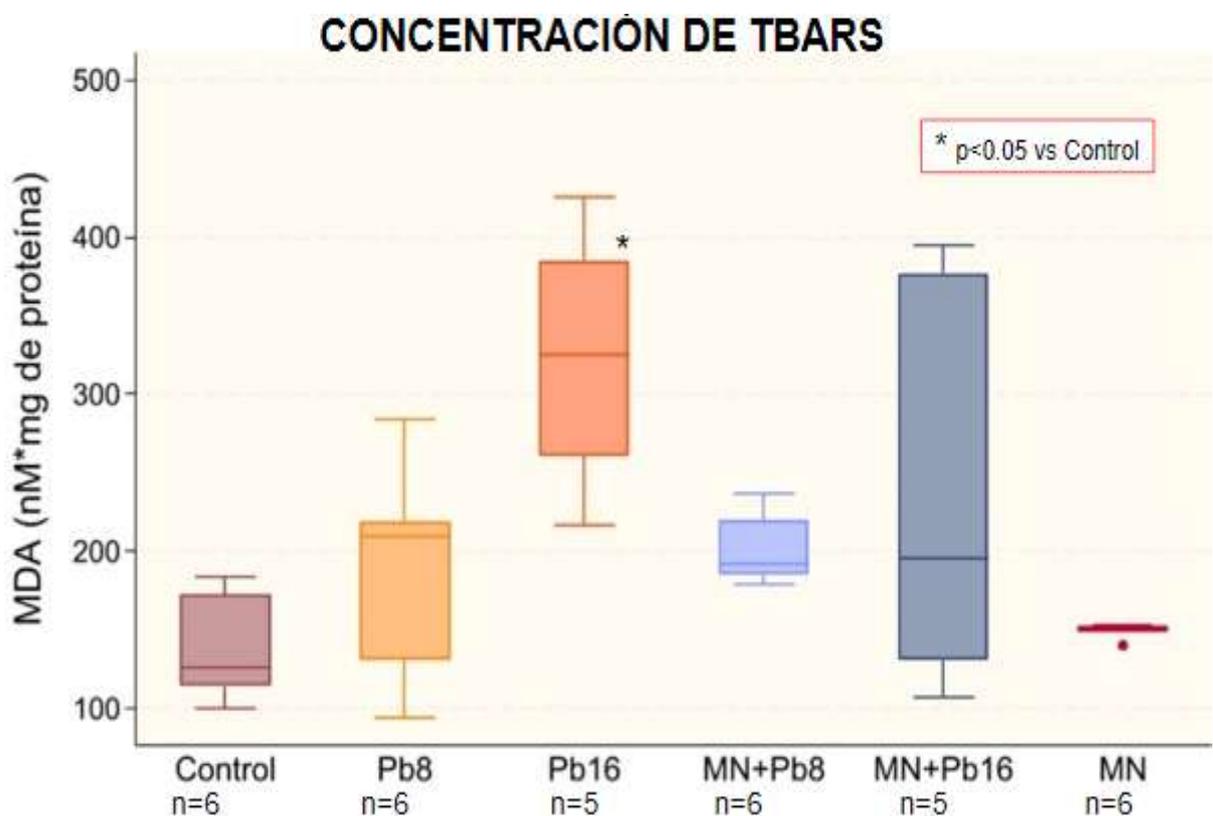
En la figura 6, se visualiza en ambos grupos tratados con solo Pb una disminución del conteo de espermatozoides en epidídimos, pero solo los grupos tratados con la dosis más alta (Pb16) presentaron una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) comparado con el Control y MN. El tratamiento con maca negra (MN + Pb16) protege respecto al grupo tratado solo con plomo (Pb16), ya que presenta un aumento significativo ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Conteo de espermatozoides en epidídimo de ratas adulto macho. Se observa una disminución  $*p < 0.01$  Pb16 en comparación con el Control; y  $+p < 0.01$  el grupo Pb16 comparado con el grupo con maca (MN). Además, se encontró un aumento  $^a p < 0.05$  entre el grupo MN+Pb16 comparado con el Pb 16. Prueba estadística usada Kruskal Wallis – Dunn Test.

## CONCENTRACIÓN DE MDA EN TESTICULO

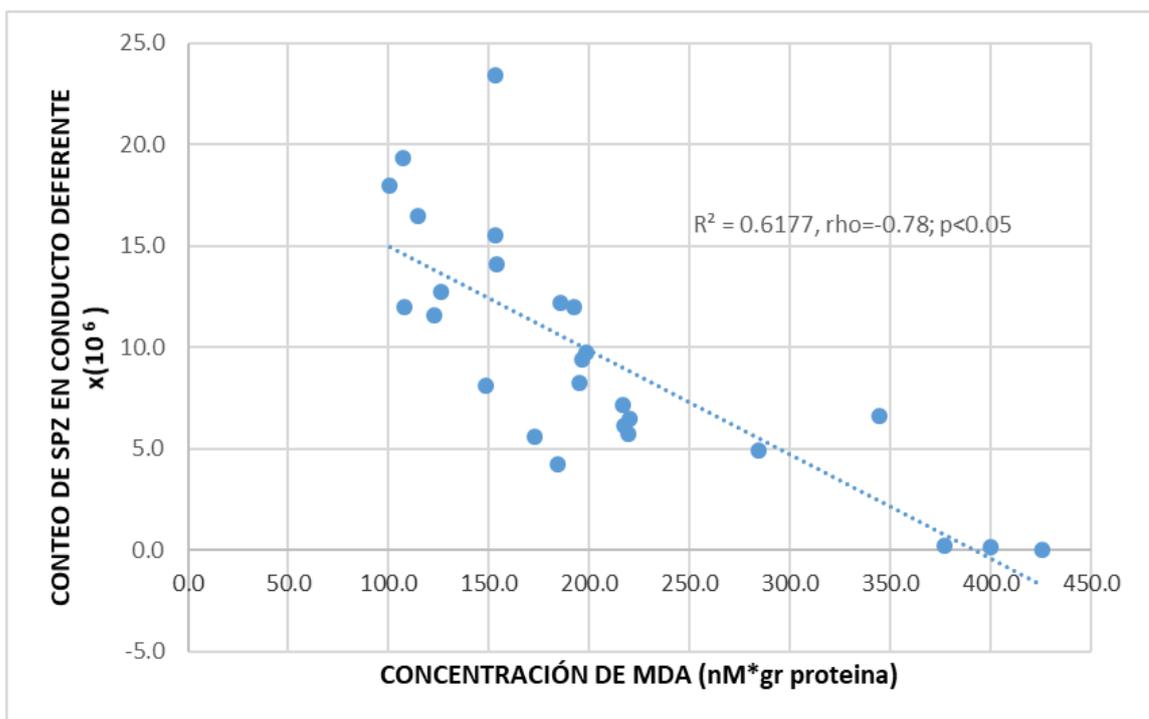
Se visualiza que la lipoperoxidación en testículos aumentó en los grupos tratados solo con Pb y esta disminuyó en los grupos tratados con acetato de Pb más maca negra. Sin embargo, no se encontró diferencias significativas al hacer cruces entre el control versus los grupos tratados con plomo, debido a la dispersión de los datos visualizados en el gráfico de caja y bigotes. Sin embargo, se encontró un aumento significativo de concentración de MDA en el grupo tratado con Pb 16 respecto al grupo Control (Figura 7). También, se observa en el grupo MN un valor atípico u outliers (círculo), debido a que los datos en este grupo tienen muy poca variabilidad y se concentra la mediana en 151.4, no obstante, se encontró un valor de 140.2, considerado como un valor atípico leve. Asimismo, el grupo de MN+Pb16 presenta gran variabilidad y asimetría de los datos lo cual dificulta establecer una diferencia significativa respecto al grupo con Pb16.



**Figura 7.** Concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La lipoperoxidación en testículos se midió a través de la concentración de malondialdehído (MDA) por mg de proteína. El grupo con 16 mg/kg de AcPb (Pb 16) es \*p<0.05 respecto al Control. Prueba de Kruskal Wallis – Dunn Test.

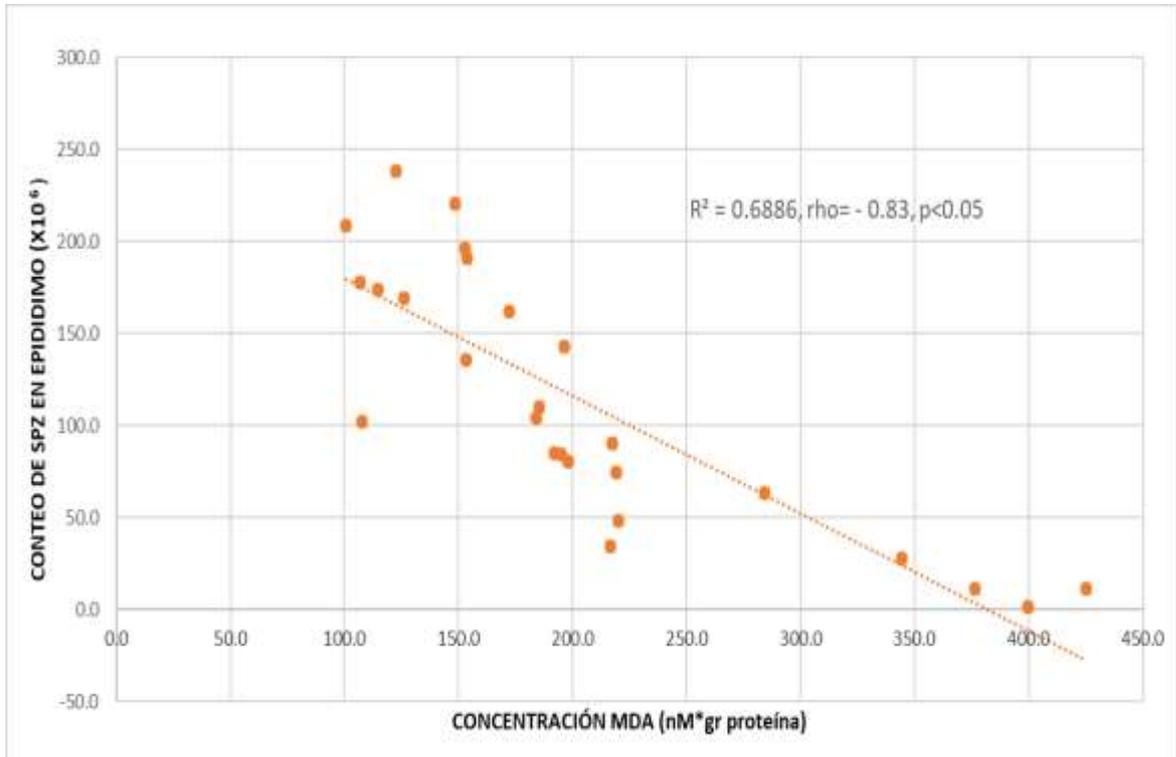
## CORRELACIÓN ENTRE CONTEO DE ESPERMATOZOIDES Y CONCENTRACIÓN DE MDA

En la figura 8, se observa en el eje Y el conteo de espermatozoides en el conducto deferente; y en el eje X la concentración de MDA en el testículo. Asimismo, la asociación de ambas variables da una correlación inversamente proporcional significativa ( $\rho = -0.78$ ). Es decir que, a mayor concentración de MDA, da un menor conteo de espermatozoides en conducto deferente.



**Figura 8.** Correlación entre la concentración de MDA (nM/gr de proteína) y el conteo de espermatozoides en el conducto deferente ( $\times 10^6$ ) en ratas adultos macho. Se utilizó la correlación de Spearman ( $\rho = -0.78$ ;  $p < 0.05$ ).

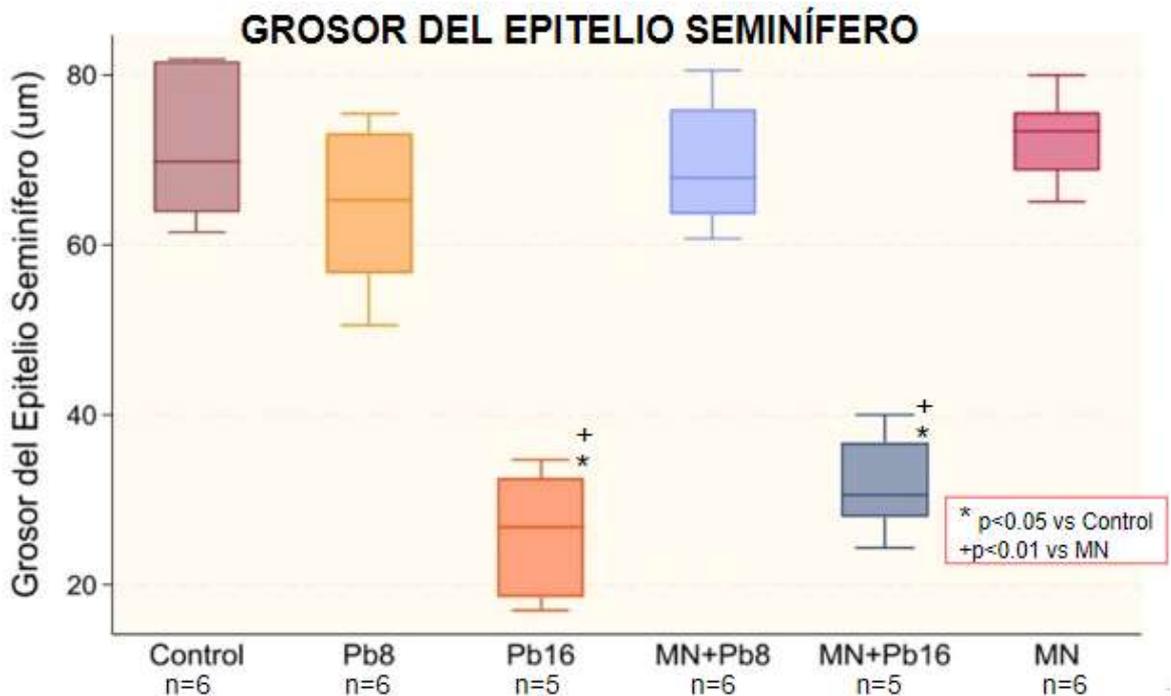
Al realizar la asociación entre el conteo de espermatozoides en epidídimo y la concentración de MDA (Figura 9), se logró observar, de igual manera, una correlación inversa significativa ( $\rho = -0.83$ ). Por lo que, a mayor concentración de MDA, menor es el conteo de espermatozoides en el epidídimo.



**Figura 9.** Correlación entre la concentración de MDA (nM/gr de proteína) y el conteo de espermatozoides en el epidídimo ( $\times 10^6$ ) en ratas adultos macho. Se utilizó la correlación de Spearman ( $\rho = -0.83$ ;  $p < 0.05$ ).

### **GROSOR DE TÚBULOS SEMINÍFEROS EN TESTICULO**

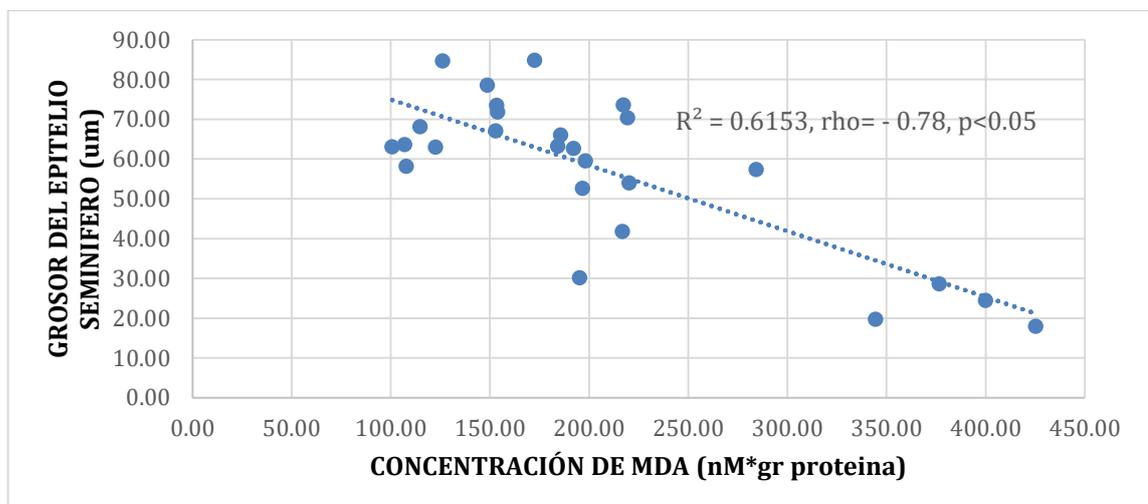
En la Figura 10, se muestra que los datos de los grupos con mayor dosis de plomo (Pb 16 y MN+Pb16) fueron significativos ( $p < 0.05$ ) respecto al Control y ( $p < 0.01$ ) al grupo con maca (MN). Al comparar los grupos con solo plomo (Pb8 y Pb16) con los grupos con maca más plomo (MN+Pb8 y MN+Pb16), se visualiza en la caja que la mediana es mayor (tiende a la derecha) en los grupos con maca en comparación con los grupos que tienen solo las dosis de plomo, lo que significa que podría haber un efecto protector dado por la maca en la espermatogénesis frente al estrés oxidativo generado por el AcPb; sin embargo, este no es significativo.



**Figura 10.** Grosor del epitelio de los túbulos seminíferos (um). El grupo con 16 mg/kg de AcPb (Pb16) es \*p<0.05 respecto al control y +p<0.01 respecto al grupo con maca negra (MN). Prueba de Kruskal Wallis - Dunn Test.

### CORRELACIÓN ENTRE GROSOR DEL EPITELIO SEMINÍFEROS Y CONCENTRACIÓN DE MDA

En la figura 11, se logra observar que hay una correlación inversamente proporcional ( $\rho = -0.78$ ) entre el grosor del epitelio seminíferos ( $\mu\text{m}$ ) y concentración de MDA.

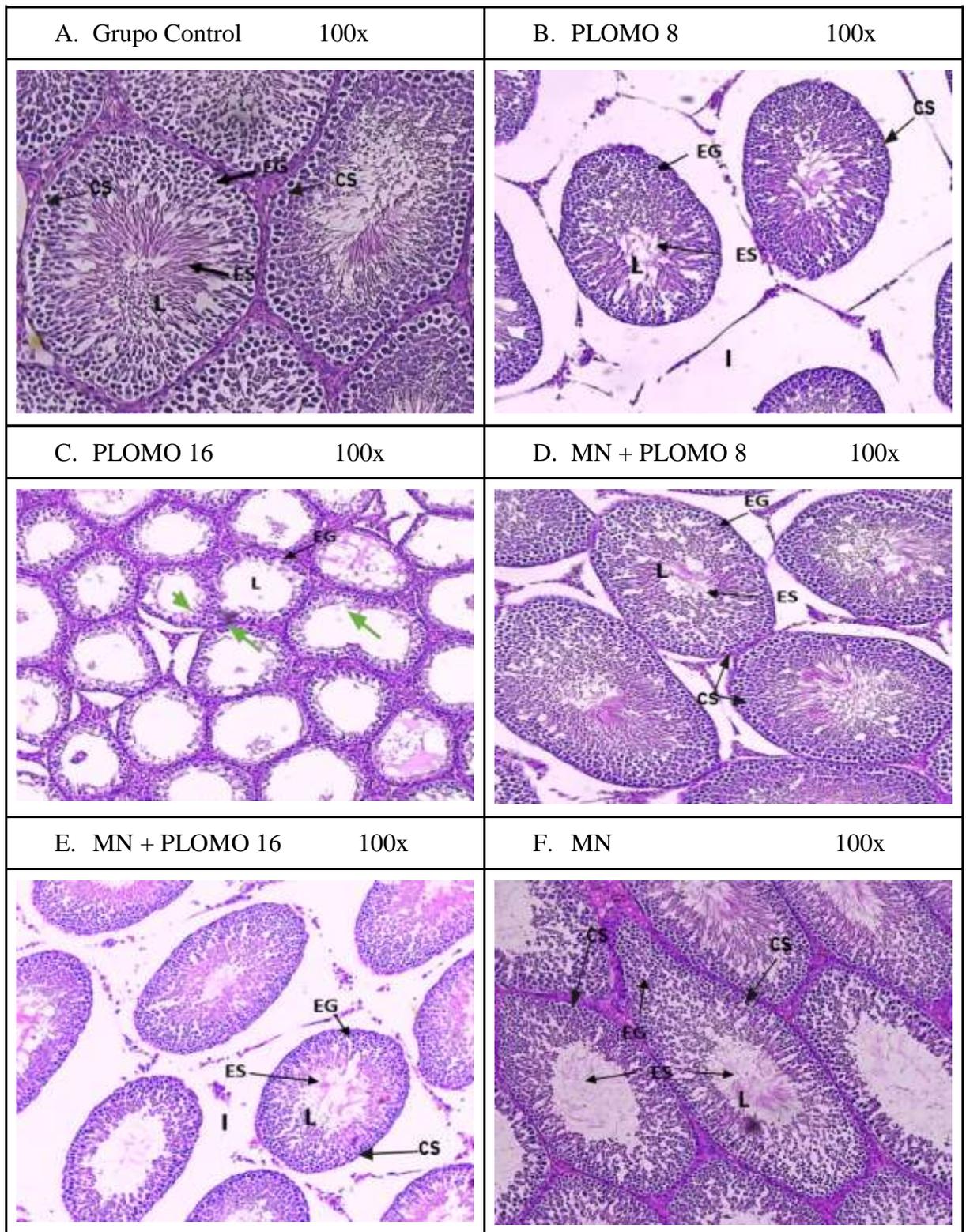


**Figura 11.** Correlación entre la concentración de MDA (nM/gr de proteína) y el grosor de epitelio seminíferos ( $\mu\text{m}$ ) en ratas adultos macho. Se utilizó la correlación de Spearman ( $\rho = -0.78; p < 0.05$ ).

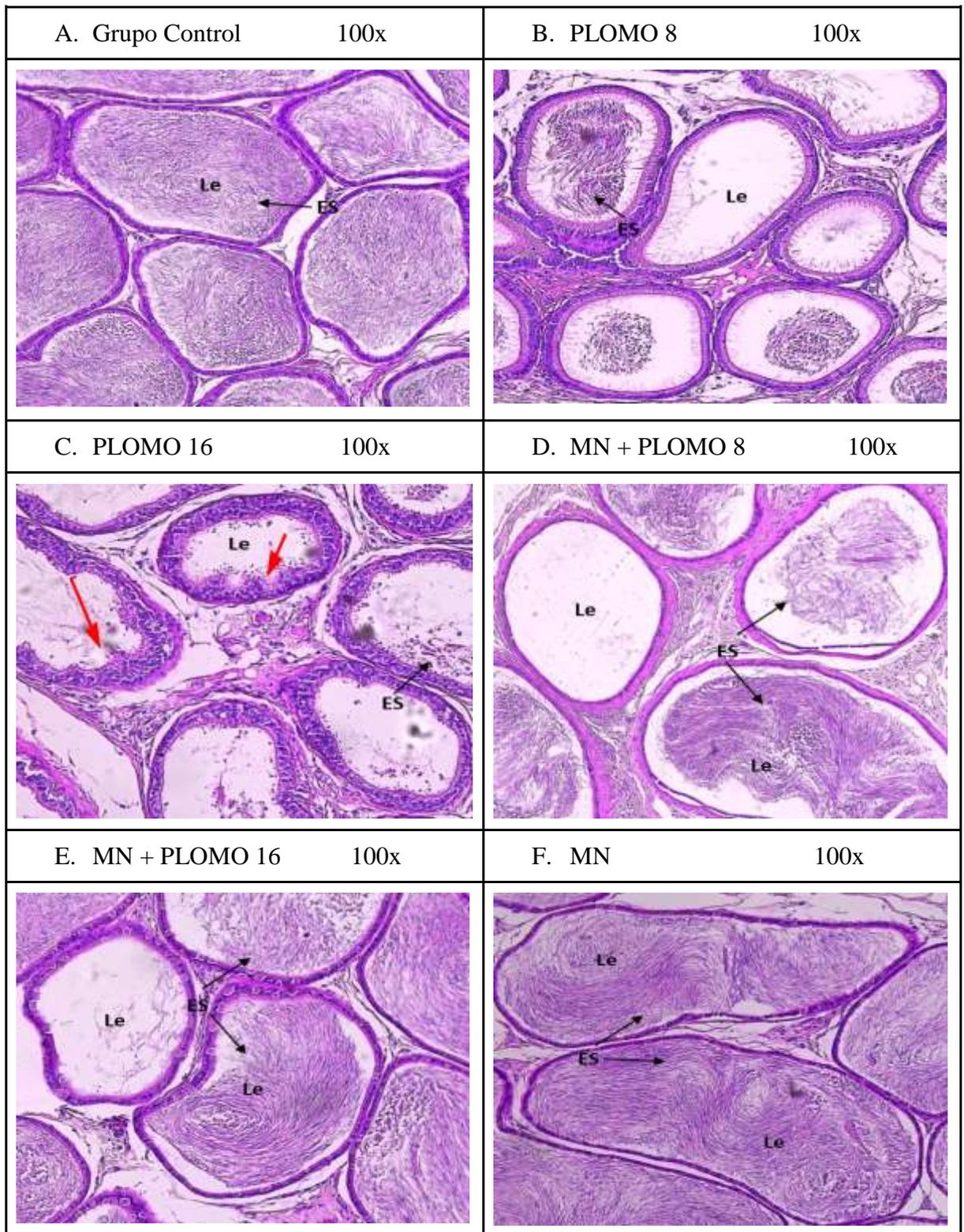
## **CORTES HISTOLÓGICOS EN TESTÍCULO Y EPIDÍDIMO**

Los cambios de los cortes histológicos en testículos y epidídimos de ratas entre los grupos control y tratamiento se muestran en la figura 12 y 13. El grupo control y grupo MN muestran contornos bien definidos ovalados y redondos. Los túbulos seminíferos presentan una estructura normal; asimismo, se puede observar las diferentes células espermatogénicas (EG) en el epitelio seminífero, así como algunos espermatozoides (ES) en la luz del túbulo seminífero (L). En cambio, los grupos tratados con solo Pb (Plomo 8 y Plomo 16), muestran una arquitectura testicular con ligero daño, un encogimiento de los túbulos seminíferos comparado con el grupo control y MN. Además, en el grupo tratado solo con Plomo 16 se observa la atrofia tubular (flecha verde), ya que, hay poca cantidad de células germinales, túbulos revestidos solo por células de Sertoli y diámetro tubular disminuido. Los grupos tratados con maca negra (MN+Plomo 8 y MN+Plomo 16), protegieron la arquitectura testicular de los túbulos seminíferos (Figura 12).

En la Figura 13, se visualiza, en los grupos Plomo 8 y Plomo 16, disminución de espermatozoides en el epidídimo. Asimismo, en el grupo Plomo 16, también se observa un cambio cribiforme en el epitelio de la cisterna del epidídimo, dado que se observa luces intraepiteliales e hiperplasia epitelial (flecha roja). Sin embargo, en los grupos tratados con maca negra, se observa una recuperación de espermatozoides dentro de la luz epididimaria (Le) y mejorar arquitectura del epitelio.



**Figura 12.** Histología del testículo izquierdo de ratas adultos macho. A) Grupo control, B) grupo con dosis de 8 mg/kg de Ac.Pb; C) Grupo con dosis de 16 mg/kg de Ac.Pb; D) Grupo con dosis de 8 mg/kg de Ac.Pb + 50 mg/d de MN; E) Grupo con dosis de 16 mg/kg de Ac.Pb + 50 mg/d de MN; F) Grupo con dosis de 50 mg/d de MN. EG: espermatozonias; ES: espermatozoides; CS: células Sertoli; L: luz del túbulo seminífero; I: espacio intersticial; flecha verde: atrofia tubular.



**Figura 13.** Histología de la cola del epidídimo de ratas adultos macho. Histología del testículo izquierdo de ratas adultos macho. A) Grupo control, B) grupo con dosis de 8 mg/kg de Ac.Pb; C) Grupo con dosis de 16 mg/kg de Ac.Pb; D) Grupo con dosis de 8 mg/kg de Ac.PB + 50 mg/d de MN; E) Grupo con dosis de 16 mg/kg de Ac.PB + 50 mg/d de MN; F) Grupo con dosis de 50 mg/d de MN. ES: espermatozoides; Le: luz del conducto epididimario; flecha roja: Luz intraepitelial e hiperplasia epitelial.

## VIII. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el efecto protector y antioxidante de la maca negra en la espermatogénesis de ratas adultas expuestas a estrés oxidativo por acetato de plomo. Para esto, se evaluaron los pesos corporales al inicio y al final del tratamiento, los pesos de los órganos reproductivos (testículo y epidídimo), y el conteo de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente. Asimismo, para determinar el efecto antioxidante, se determinó la concentración de MDA en el testículo, el grosor de los túbulos seminíferos en testículo, y se observó la histología de los testículos y epidídimos.

En este estudio se observó una disminución significativa del delta de los pesos corporales (-60 g en promedio) en los grupos tratados con AcPb respecto al grupo Control y grupo con MN. Además, se encontró que el peso de los testículos y epidídimos disminuyó significativamente únicamente con la dosis de 16 mg/kg/día (Pb 16 y MN+Pb 16) versus el control y MN. La literatura respecto al efecto del AcPb en el peso corporal; y peso de testículos y epidídimo es diversa. En este sentido, se ha reportado un estudio en donde la administración de AcPb a 1.5 mg/kg por vía intraperitoneal durante 8 días no mostró disminución del peso corporal [54]; asimismo, otro estudio reportó que el peso corporal; de testículo y epidídimo no disminuyó significativamente con la exposición crónica (durante 6 semanas) a la misma dosis de AcPb (1.5 mg/kg/semanal vía intraperitoneal) comparado con el control [55]. En contraparte, otros estudios reportan que una administración por vía oral a dosis más elevadas (entre 20 y 100 mg/kg/día) con un tiempo de exposición entre 21-56 d genera una disminución en el peso corporal y de órganos estudiados en el presente estudio. Esto denota que el efecto tóxico del plomo está en función de la dosis, tiempo de exposición y vía de administración [56,57,58].

Asimismo, se observó que en los grupos que se administró acetato de plomo más maca negra en comparación con los grupos que solo se les administró acetato de plomo no hubo aumento significativo del peso. En los 4 grupos con plomo (Pb8, Pb 16, MN+Pb 8 y MN+Pb 16) los pesos corporales de los animales experimentales disminuyeron. Lo cual se debe a la toxicidad aguda del plomo que provocó una disminución del peso corporal en la cepa SD (Sprague-Dawley) de las ratas, a pesar de estar consumiendo maca negra. Un estudio que tuvo como objetivo determinar la capacidad antioxidante de los betaglucanos frente al estrés oxidativo provocado por plomo en ratas de la cepa SD,

determinó que en los grupos tanto con el tratamiento de acetato de plomo como en los grupos con Pb más betaglucanos, el peso corporal de los animales experimentales disminuyó, lo cual se asocia a un efecto directo del Pb en el aparato digestivo al disminuir la absorción de nutrientes [59]. Asimismo, estudios mencionan que el plomo se une a los componentes de las membranas celulares mediante una actividad indirecta y modifica la susceptibilidad del sistema de defensa antioxidante en los enterocitos [59,60]. Por esta razón, en a nuestro estudio, se observó que el Pb disminuyo el peso corporal de las ratas al inhibir la capacidad antioxidante de la maca negra en el sistema digestivo.

Otra variable estudiada fue el conteo de espermatozoides en conducto deferente y epidídimo como parte del efecto protector de la maca negra frente a la toxicidad inducida por el plomo.

El conteo de espermatozoides en conducto deferente se redujo con la administración de 8 mg/kg/día, sin embargo, no se halló diferencias significativas. En cambio, al comparar el grupo con la dosis de 16 mg/kg/día versus el control, se encontraron diferencias significativas entre estos grupos. Asimismo, en los epidídimos se observó una reducción significativa en el conteo de espermatozoides en los grupos tratados con la dosis más alta de AcPb (Grupo Pb16 y MN+Pb16) comparado con el control. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura, en donde la administración de AcPb disminuyó significativamente el conteo de espermatozoides en conducto deferente y epidídimo [56,57,61,62]. Esto se debe a que los espermatozoides son especialmente susceptibles al daño de los radicales libres como los ROS, ya que aproximadamente 30% de los ácidos grasos que componen la membrana plasmática están compuestos por ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) [63], estos contienen dobles enlaces en su estructura química lo cual facilita el ataque de los ROS a los átomos de hidrógeno expuestos, provocando cambios en la permeabilidad; estructura y funcionalidad de los espermatozoides. En última instancia, el efecto nocivo provocado por ROS, inducido por la exposición a AcPb, ocasiona muerte celular a través de la vía apoptótica intrínseca (mediada por mitocondrias), en donde el plomo reacciona con los grupos tiol (SH-) de los complejos respiratorios en la mitocondria provocando ROS y la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial, seguidamente se libera el citocromo C, dando como resultado la activación de las caspasas 3 y 9 provocando la muerte celular [64].

En el conducto deferente, el tratamiento con maca negra logró aumentar el recuento de espermatozoides de  $8.4 \times 10^6$  en el grupo Pb8 a  $10.9 \times 10^6$  en el grupo MN+ Pb 8. El grupo MN+Pb16 mostró diferencias significativas respecto al grupo que solo se le administró Pb16. En el epidídimo, la maca negra protege el efecto deletéreo del AcPb en el conteo de espermatozoides. Estos resultados concuerdan, en donde la maca negra mejora significativamente el recuento de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente. En este sentido, Gasco y colaboradores, reportaron que la administración crónica (84 d) de extracto acuoso de maca negra (1 g/kg peso corporal) mejoró significativamente el recuento de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente [47]. El estudio de Gonzales C y colaboradores apoyo aún más este hallazgo en donde la administración a largo y corto plazo (7 y 42 días) de extracto acuoso de maca negra (1.66 g/kg) aumentó significativamente el recuento de espermatozoides en epidídimo de ratas macho [65]. Asimismo, Gonzáles G y colaboradores, demostraron que la administración de extracto acuoso de maca negra (2 g/kg de peso corporal) mejoró el recuento de espermatozoides en epidídimo a partir del día 1 de tratamiento y día 3 en el conducto deferente [66]. Estudios más recientes, reportaron que extracto acuoso y metanólico de maca negra (1 g/kg de peso corporal durante 3 días) mostraron un conteo de espermatozoides superior, en epidídimo y conducto deferente, que los extractos de maca amarilla [67]. Cabe destacar que la dosis de maca negra varía en cada estudio, así como el método de obtención del extracto, nuestro estudio se basó en estudios previos que mostraron que la administración de MN atomizada a una dosis de 50 mg/día aumenta el conteo de espermatozoides en epidídimo [65, 67]; sin embargo, todos estos estudios fueron realizados en ausencia de exposición a un agente tóxico como el AcPb, en relación a ello, un estudio previo demostró que el extracto acuoso de MN (666 mg de MN pulverizada/día) revirtió el efecto dañino del AcPb (dosis de 8 y 16 mg/kg) en el recuento de espermatozoides en epidídimo. Es importante mencionar que, el extracto acuoso fue obtenido de manera tradicional a partir de hipocótilos secos de maca negra hervidos en agua que posteriormente se filtró dando como resultado una concentración de 333 mg de hipocótilos pulverizados en 1 ml de solución [15]. En contraste, este estudio empleó una dosis única de 50 mg de MN atomizada/ml/día de extracto acuoso de maca negra.

Otro fenómeno estudiado fue la lipoperoxidación en testículos como parte del desbalance en la actividad redox propiciada por el AcPb. En este estudio, se observó un aumento en la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en los grupos tratados solo con AcPb (8 y 16 mg/kg); Estos resultados concuerdan con Santhoshkumar R y colaboradores así como Hassan E y colaboradores, quienes informaron que una dosis de 20 mg/kg/día de AcPb durante 10 d y 56 d respectivamente, aumentó la concentración de TBARS [58,68]; en adición, Oyeyemi A y colaboradores, notificaron que una dosis menor (10 mg/kg/día) aumentó significativamente el MDA [61]. Del mismo modo, dosis por encima de 50 mg/kg de AcPb provocan estrés oxidativo medido a través de la concentración teórica de MDA [57,62]. El aumento de la concentración de TBARS inducido por el AcPb altera la espermatogénesis, esto se evidencia en la correlación inversa entre el conteo de espermatozoides en conducto deferente y epidídimo, con un valor R de 0.78 y 0.83, respectivamente.

Por otro lado, la concentración de MDA disminuyó en los grupos tratados con AcPb más maca negra; aunque, estas diferencias no son significativas. Se conoce, que la maca *in vitro* tiene una baja actividad antioxidante al ser comparada con otras plantas como el camu camu, el yacón, entre otros. Sin embargo, estudios han encontrado, que la maca tiene la capacidad de aumentar la defensa antioxidante *in vivo*. Braga-Vela y colaboradores, menciona que la maca negra aumenta los niveles de superóxido dismutasa y catalasa (enzimas antioxidantes) en humanos jóvenes [69]. Además, otros estudios indican que la maca puede disminuir los niveles de TBARS aumentados por estrés oxidativo provocado por la exposición a la irradiación ultravioleta, esfuerzo físico o gran altitud; sin embargo, estos estudios se han realizado en hígado, músculo y cerebro, más no directamente en los órganos reproductivos. No obstante, estudios han reportado que la maca tiene la capacidad de revertir los efectos tóxicos provocados por ROS, en la espermatogénesis [12,13]. Dichos estudios, sugieren que la maca debido a su contenido de macamidas, puede generar un efecto de antioxidante disminuyendo la lipoperoxidación en testículos y aumentando la concentración de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) y antioxidantes no enzimáticos (GSH), así como una disminución de la apoptosis medida a través del ensayo TUNEL [13]. Dicho efecto se observó con la administración de extracto etanólico que contenía nueve macamidas y una macamida sola (octadecatrienamida). Esta diferencia en los resultados, podría deberse a los diferentes

tipos de extractos de maca negra utilizados en la investigación, el presente estudio empleó extracto atomizado de maca negra disuelto en agua; el cual se ha reportado en estudios que contienen una mayor concentración de polifenoles y menor cantidad de macamidas y alcaloides en comparación con el extracto etanólico [70], siendo la maca negra el ecotipo con mayor concentración de macamidas en comparación con otros ecotipos de maca [71]. Si bien los polifenoles presentes en la maca negra poseen actividad antioxidante [14, 70] medida a través del ensayo de eliminación de radical DPPH, los resultados presentados sugieren que dicha actividad es insuficiente para proteger la lipoperoxidación generada por el AcPb. Por lo que, el extracto acuoso de maca negra actuaría contra el estrés oxidativo a través de otra vía y no actuaría en sí mismo como un antioxidante en el testículo de ratas machos tratadas con AcPb.

Respecto a los cortes histológicos, se visualizó que los grupos tratados con solo plomo (Pb8 y Pb16), muestran una arquitectura testicular con ligero daño, un encogimiento y aplanamiento de los túbulos seminíferos comparado con el grupo Control y MN. Además, en el grupo Pb16, se logra observar de manera más notoria la atrofia tubular, ya que se visualiza ausencia de células germinales y diámetro tubular disminuido comparado con el grupo Control y MN. Estos resultados se confirman en diversos estudios experimentales en ratas, en donde notifican daños leves en el epitelio de los túbulos seminíferos con desorganización e hialinización, así como pérdida y degeneración leve de células espermatogénicas [58,61,62,68,72]. Adicionalmente, se cuantificó el grosor del epitelio seminífero, diversos factores pueden afectar el grosor del epitelio seminífero, en el presente estudio se observó que la exposición a 16 mg/kg de AcPb (Pb16) redujo significativamente el grosor epitelial respecto al control (Figura 10), Este resultado se alinea con los estudios de Undaryati Y 2023 y Suwaibatul A 2023 [49,73] quienes demostraron que el AcPb disminuye significativamente el grosor del epitelio seminífero, ya que el plomo penetra con facilidad los testículos en donde genera depleción de las enzimas antioxidantes y produce ROS generando estrés oxidativo. Lo cual altera la permeabilidad de la membrana mitocondrial dando como resultado la liberación del citocromo C al citosol desencadenando la apoptosis de las células germinales. Esta premisa se refuerza con la correlación inversa entre el grosor del epitelio seminífero y la concentración de TBARS, con un valor rho de -0.78, encontrado en el presente estudio. Además, el plomo puede alterar el eje hipotalámico-hipofisario-testicular, debido a que

disminuye la secreción de la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), que conduce a la degeneración de la espermatogénesis, disminuyendo las células espermatogénicas y por tanto el grosor del epitelio [49,73]. Adicionalmente, se reportó que dosis de 100 mg/kg/día provocan destrucción de los túbulos seminíferos con una notoria pérdida de células germinales [57]. Asimismo, estudios previos, han observado que el acetato de plomo altera la mitosis de las espermatogonias, los cambios morfológicos de los espermatozoides y la etapa de espermiación, esto se asocia con la disminución de testosterona en ratas expuestas a acetato de plomo [15].

Por otro lado, los grupos tratados con maca negra y plomo (MN+Pb8 y MN+Pb16), protegieron la arquitectura testicular de los túbulos seminíferos, además, se observa que el espacio intersticial del túbulo seminífero y el tamaño, de dichos grupos, son similares al grupo control y al grupo con solo maca negra. Estos resultados tienen relación con otros estudios, en donde se observa que la maca negra interviene y protege a las espermatogonias y reduce la muerte celular de las células de Sertoli [15]. Estas células se encargan de formar la barrera hematotesticular. además, contribuyen en el desarrollo y nutrición de las células germinales.

En los cortes histológicos de epidídimo, se observó que en los conductos epididimarios hubo una disminución de espermatozoides en la luz, en los grupos tratados con solo AcPb (Pb8, Pb16) respecto al control. La diferencia es mayor en el grupo que solo se le administró plomo (AcPb 16 mg/kg de peso), donde la mayoría de conductos epididimarios se encuentran vacíos; también, se refleja cambio cribiforme en el epitelio del conducto epididimario. Esto evidencia el daño que causa el AcPb. Esto evidencia el daño que causa el AcPb, confirmando otros estudios que han llegado a la conclusión de que el AcPb provoca alteraciones en la espermiación y con ello la liberación de espermatozoides hacia el epidídimo [15]. Sin embargo, se pudo observar que en los grupos con maca negra y plomo (MN+Pb8 y MN+Pb16), aún hay presencia de espermatozoides en la luz de los conductos epididimarios. Estudios anteriores, han demostrado que la maca suele tener un mayor efecto protector en el epidídimo, ya que aumenta la liberación de espermatozoides, y a su vez el almacenamiento de estos en la cola del epidídimo [12, 15, 74]. Por otra parte, es importante recalcar que los resultados

de este presente trabajo, respecto a los cortes histológicos del testículo y del epidídimo, son subjetivos, por lo que se puede asumir consideraciones generales [74].

## **IX. CONCLUSIONES**

El tratamiento con acetato de plomo provocó un efecto tóxico a nivel testicular, del epidídimo y conducto deferente. En el epidídimo y conducto deferente disminuyó el conteo de espermatozoides; y en el testículo, aumenta la concentración de TBARS, disminuye el grosor del epitelio seminífero y genera daños en la arquitectura tisular de los túbulos seminíferos.

El tratamiento con maca negra, a dosis diaria de 50 mg, protege del efecto deletéreo producido por el acetato de plomo, en el conteo de espermatozoides en epidídimo y conducto deferente.

El extracto acuoso de maca negra atomizada, posee una baja actividad antioxidante y por tanto no protegió el tejido testicular de la lipoperoxidación inducida por acetato de plomo, medida a través de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Según lo observado en los cortes histológicos, la maca negra protege la estructura testicular, y aumenta el almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo. Sin embargo, se observó que la maca negra no logró aumentar el grosor del epitelio seminífero ante el efecto deletéreo del plomo.

## **X. LIMITACIONES**

- Es importante mencionar que estos resultados deben ser tomados con cautela debido a que la fuerza estadística para establecer diferencias entre los grupos tratados disminuyó producto de la pérdida de animales experimentales.
- Debido al diseño del estudio, se cuantificó el estrés oxidativo a través de la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), en donde el malondialdehído (MDA) es el principal producto de la lipoperoxidación de la membrana de las células del tracto reproductivo masculino. Dicha variable no

refleja de manera completa el efecto del estrés oxidativo producido por el AcPb, por ende, resulta una limitante del estudio.

- Las diferencias en la histología testicular y en epidídimo son de carácter subjetivo debido a que solo se contrastaron las imágenes obtenidas a través del microscopio óptico.

## **XI. FORTALEZAS**

- El diseño experimental planteado contribuyó a concluir que la maca negra no actuaría como antioxidante per se en el estrés oxidativo inducido por AcPb.
- Este estudio contribuye a establecer posibles métodos profilácticos para el tratamiento de la infertilidad masculina causada por la contaminación por acetato de plomo.
- El presente estudio permite que se realicen futuras investigaciones sobre los beneficios de la maca negra en la reproducción masculina y el mecanismo en el que actúa sobre la espermatogénesis.

## **XII. RECOMENDACIONES**

- En futuras investigaciones, se debería evaluar el mecanismo de acción de la maca negra como actividad antiapoptótica sobre la espermatogénesis, para una mayor contribución del estudio.
- La mayoría de estudios que evalúan perfiles de metabolitos y macamidas son realizados en extractos de maca negra cultivada en China, por tanto, resulta interesante investigar el perfil de macamidas y metabolitos secundarios de la maca negra peruana y la vía por la cual actuaría positivamente sobre la espermatogénesis, ya que la composición de dichos metabolitos varía en función a las características del suelo en donde se cultiva la maca.

### **XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Bulathgama U, Lakshman N, Bulugahapitiya V. APPLIED BIO-SYSTEMS TECHNOLOGY Recent Trends in Functional Foods and Nutraceuticals as Health-Promotive Measures: A Review. 1 de enero de 2022;2:11-33.
2. Troya-Santos J, Ale-Borja N, Suárez-Cunza S. Capacidad antioxidante in vitro y efecto hipoglucemiante de la maca negra (*Lepidium meyenii*) preparada tradicionalmente. Rev Soc Quím Perú. enero de 2017;83(1):40–51.
3. Gonzales-Arimborgo C, Yupanqui I, Montero E, Alarcón-Yaquette DE, Zevallos-Concha A, Caballero L, et al. 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. septiembre de 2016;9(3):49.
4. 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. enero de 2014;31(1):100–10.
5. Bassas DL. Espermatogénesis e Infertilidad. 2001;18:7.
6. Agarwal A, Baskaran S, Parekh N, Cho CL, Henkel R, Vij S, et al. Male infertility. The Lancet. 23 de enero de 2021;397(10271):319-33.
7. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:8416763.
8. Boskabady M, Marefati N, Farkhondeh T, Shakeri F, Farshbaf A, Boskabady MH. The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review. Environment International. 1 de noviembre de 2018;120:404-20.
9. Lopes ACBA, Peixe TS, Mesas AE, Paoliello MMB. Lead Exposure and Oxidative Stress: A Systematic Review. En: de Voogt P, editor. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 236 [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [citado 22 de enero de 2024]. p. 193-238. (Reviews of Environmental Contamination and Toxicology). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20013-2_3)
10. Tuncer SÇ, Akarsu SA, Küçükler S, Gür C, Kandemir FM. Effects of sinapic acid on lead acetate-induced oxidative stress, apoptosis and inflammation in testicular tissue. Environmental Toxicology. 2023;38(11):2656-67.

11. He Y, Zou L, Luo W, Yi Z, Yang P, Yu S, et al. Heavy metal exposure, oxidative stress and semen quality: Exploring associations and mediation effects in reproductive-aged men. *Chemosphere*. 1 de abril de 2020;244:125498.
12. Greco A, Del Prete C, De Biase D, Palumbo V, Albanese S, Bruzzese D, et al. Effects of Oral Administration of *Lepidium meyenii* on Morphology of Mice Testis and Motility of Epididymal Sperm Cells After Tetrahydrocannabinol Exposure. *Front Vet Sci* [Internet]. 2021 [citado el 2 de enero del 2024];8. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.692874>
13. Yu Z, Liu H, Li D, Chen X, Ao M, Jin W, et al. N-(3-Methoxybenzyl)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida from maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ameliorates corticosterone-induced testicular toxicity in rats. *Food Funct*. el 23 de septiembre de 2020;11(9):7762–74.
14. Del Prete C, Tafuri S, Ciani F, Pasolini MP, Ciotola F, Albarella S, et al. Influences of dietary supplementation with *Lepidium meyenii* (Maca) on stallion sperm production and on preservation of sperm quality during storage at 5 °C. *Andrology*. 2018;6(2):351–61.
15. Rubio J, Riqueros MI, Gasco M, Yucra S, Miranda S, Gonzales GF. *Lepidium meyenii* (Maca) reversed the lead acetate induced—Damage on reproductive function in male rats. *Food Chem Toxicol*. el 1 de julio de 2006;44(7):1114–22.
16. Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(9):689-709.
17. Kaltsas, A. Oxidative Stress and Male Infertility: The Protective Role of Antioxidants. *Medicina*. 2023; 59(10): 1769.
18. Marrugo DG, Méndez DL, Silva JP, Conde CG, Méndez GL. Metal fumes: exposure to heavy metals, their relationship with oxidative stress and their effect on health. *Prod Limpia*. 2019;14(2):8–20.
19. Flora G, Gupta D, Tiwari A. Toxicity of lead: A review with recent updates. *Interdiscip Toxicol*. junio de 2012;5(2):47–58.
20. Garza A, Vega R, Soto E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. marzo de 2006;12(3):RA57-65.
21. Valdivia Infantas, Melinda. Intoxicación por plomo. *Rev Soc PerMedInt*. 2005;18(1):22-7.
22. Larrañaga C, Impacto de la Nutrición diferencial durante la preñez y lactancia sobre la proteína de shock térmico HSP90 $\beta$  en testículos de ratas adultas [Tesis de

- Doctorado]. Universidad de la República [Internet], 2017. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/24984/1/FV-32980.pdf>
23. Hall JE, Hall ME, Guyton AC, Xavier Gasull Casanova, Comes N, Soto D. Funciones reproductoras y hormonales masculinas (y función de la glándula pineal). Guyton y Hall tratado de fisiología médica. 13th . Barcelona: Elsevier; 2021. p. 1021-1027.
  24. Universidad Nacional Autónoma de México. Reproducción de los animales domésticos. Espermatogénesis [Internet]. Disponible en: <https://reproduccionanimalesdomesticos.fmvz.unam.mx/libro/capitulo3/espermatogenesis.html>
  25. Velasco I. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO FACULTAD DE CIENCIAS “Estudio de la síntesis de DNA mediante la incorporación de BrdU durante la espermatogénesis de la rata” [Internet]. [cited 2024 Feb 9]. Available from: <http://132.248.9.195/ptd2013/enero/0687171/0687171.pdf>
  26. Alejandra M, Traverso D. Universidad de la República-Facultad de Veterinaria. Impacto de la Nutrición Diferencial durante la preñez y lactancia sobre el factor neurotrófico derivado de células gliales (gdnf) en testículos de ratas adultas [Internet]. [cited 2024 Feb 9]. Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10356/1/FV-32254.pdf>
  27. Gartner LP. Aparato reproductor masculino. Texto de histología : atlas a color. Barcelona: Elsevier; 2021. p. 607-619.
  28. María A, Stornelli R, Luzbel De La Sota. FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Manual de reproducción de animales de producción y compañía Libros de Cátedra [Internet]. Available from: [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/115121/CONICET\\_Digital\\_Nro.b16aee79-a8fc-40d4-94ba-55612410374d\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/115121/CONICET_Digital_Nro.b16aee79-a8fc-40d4-94ba-55612410374d_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
  29. Olga C, Maldonado Matos I. “Efecto de la maca roja y negra (lepidium meyenii) en la concentración de metabolitos plasmáticos de las rutas metabólicas de carbohidratos y lípidos en población adulta de puno (3820 msnm)”. Tesis grado de Maestro [Internet]. 2020. Disponible en: [https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8950/Efecto\\_MaldonadoMatos\\_Carmen.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/8950/Efecto_MaldonadoMatos_Carmen.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

30. Lee E, Park M, Kim B, Kang S. Effect of Black Maca Supplementation on Inflammatory Markers and Physical Fitness in Male Elite Athletes. *Nutrients* [Internet]. 2023 Mar 27;15(7): 1618. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37049458/>
31. 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
32. Levano G, Quispe J, Vargas D, García M, López A, Aguila L, et al. Effect of Atomized Black Maca (*Lepidium meyenii*) Supplementation in the Cryopreservation of Alpaca (*Vicugna pacos*) Epididymal Spermatozoa. *Animals* [Internet]. 2023 Jun 21 [cited 2024 Feb 10];13(13):2054–4. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10339992/#B22-animals-13-02054>
33. Inoue N, Farfan C, Gonzales GF. Effect of butanolic fraction of yellow and black maca (*Lepidium meyenii*) on the sperm count of adult mice. *Andrologia*. 2016;48(8):915–21.
34. Ericson B, Hu H, Nash E, Ferraro G, Sinitsky J, Taylor MP. Blood lead levels in low-income and middle-income countries: a systematic review. *Lancet Planet Health*. marzo de 2021;5(3):e145–53.
35. Lead poisoning [Internet]. [citado el 14 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>
36. Yucra S, Gasco M, Rubio J, Gonzales GF. Exposición ocupacional a plomo y pesticidas órganofosforados: efecto sobre la salud reproductiva masculina. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. octubre de 2008;25(4):394–402.
37. Olympio KPK, Gonçalves CG, Salles FJ, Ferreira APS da S, Soares AS, Buzalaf MAR, et al. What are the blood lead levels of children living in Latin America and the Caribbean? *Environ Int*. abril de 2017;101:46–58.
38. Eibensteiner L, Del Carpio Sanz A, Frumkin H, Gonzales C, Gonzales GF. Lead exposure and semen quality among traffic police in Arequipa, Peru. *Int J Occup Environ Health*. junio de 2005;11(2):161–6.
39. Ezejiofor AN, Orisakwe OE. The protective effect of *Costus afer* Ker Gawl aqueous leaf extract on lead-induced reproductive changes in male albino Wistar rats. *JBRA Assist Reprod*. 2019;23(3):215–24.
40. Kelainy EG, Ibrahim Laila IM, Ibrahim SR. The effect of ferulic acid against lead-induced oxidative stress and DNA damage in kidney and testes of rats. *Environ Sci*

- Pollut Res. el 1 de noviembre de 2019;26(31):31675–84.
41. Manouchehri A, Shokri S, Pirhadi M, Karimi M, Abbaszadeh S, Mirzaei G, et al. The Effects of Toxic Heavy Metals Lead, Cadmium and Copper on the Epidemiology of Male and Female Infertility. *JBRA Assist Reprod.* el 1 de agosto de 2022;
  42. Gonzales GF, Gonzales-Castañeda C, Gasco M. A mixture of extracts from Peruvian plants (black maca and yacon) improves sperm count and reduced glycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Toxicol Mech Methods.* el 1 de septiembre de 2013;23(7):509–18.
  43. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences.* 2nd ed. New York: Lawrence Erlbaum Associates; 1988.
  44. Sudjarwo SA, Sudjarwo GW, Koerniasari. Protective effect of curcumin on lead acetate-induced testicular toxicity in Wistar rats. *Res Pharm Sci.* 2017; 12(5):381–90.
  45. Leiva KP, Rubio J, Peralta F, Gonzales GF. Effect of *Punica granatum* (pomegranate) on sperm production in male rats treated with lead acetate. *Toxicol Mech Methods.* julio de 2011;21(6):495–502.
  46. Cordeiro F, Gonçalves V, Moreira N, Slobodtsov JI, de Andrade Galvão N, de Souza Spinosa H, et al. Ivermectin acute administration impaired the spermatogenesis and spermiogenesis of adult rats. *Res Vet Sci.* abril de 2018;117:178–86.
  47. Gasco M, Aguilar J, Gonzales GF. Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. *Andrologia.* agosto de 2007;39(4):151–8.
  48. Vidal JD, Whitney KM. Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity. *Spermatogenesis.* 2014;4(2):e979099. Published 2014 Dec 31. doi:10.4161/21565562.2014.979099
  49. Annisa S, Wurlina, Srianto P, Kuncorojakti S. Effect of *Psidium guajava* Juice on The Seminiferous Tubules Diameter and Epithelium Thickness in *Rattus norvegicus* Exposed by Lead Acetate. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* [Internet]. 2023 Dec 31 [cited 2024 Jul 19];11(6):989–96. Disponible en: <https://jebas.org/ojs/index.php/jebas/article/view/1779>
  50. Zahraa H. effect of flavonoids on thickness and diameter of testicular seminiferous tubules in adult males wistar rates exposed to oxidative stress by lead acetate. *International Journal of Applied Sciences and Technology.* Septiembre 2022; 2717-8234.
  51. Aguilar Diaz De Leon J, Borges CR. Evaluation of Oxidative Stress in Biological

- Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *J Vis Exp JoVE*. el 12 de mayo de 2020;(159):10.3791/61122.
52. Oncü M, Kocak A, Karaoz E, Darici H, Savik E, Gultekin F. Effect of long-term fluoride exposure on lipid peroxidation and histology of testes in first- and second-generation rats. *Biol Trace Elem Res*. septiembre de 2007;118(3):260–8.
  53. Laferriere CA, Pang DS. Review of Intraperitoneal Injection of Sodium Pentobarbital as a Method of Euthanasia in Laboratory Rodents. *J Am Assoc Lab Anim Sci JAALAS*. mayo de 2020;59(3):254–63.
  54. Lozi A, Dias F, da Silva J, Costa Araujo D, Goncalves I, Melo F, et al. Comparative Toxicology of Heavy Metals Arsenate, Arsenite, Cadmium, Chrome Vi, Lead, and Nickel in the Testes of Adult Swiss Mice After Acute Exposure. 2022.
  55. Santana F de FV, Da Silva J, Lozi AA, Araujo DC, Ladeira LCM, De Oliveira LL, et al. Toxicology of arsenate, arsenite, cadmium, lead, chromium, and nickel in testes of adult Swiss mice after chronic exposure by intraperitoneal route. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 1 de diciembre de 2023;80:127271
  56. Olayaki LA, Alagbonsi IA, Abdulrahim AH, Adeyemi WJ, Bakare M, Omeiza N. Melatonin prevents and ameliorates lead-induced gonadotoxicity through antioxidative and hormonal mechanisms. *Toxicol Ind Health*. 2018; 34(9):596-608.
  57. Nahla E, Nagmeldin O, Wang Y, Kuang M, Ali I, Yassin A, Gen-Lin W. Protective effect of betaine against lead-induced testicular toxicity in male mice. *Andrologia*. 2020; 52(7): e13600
  58. Hassan E, El-Neweshy M, Hassan M, Noreldin A. Thymoquinone attenuates testicular and spermotoxicity following subchronic lead exposure in male rats: Possible mechanisms are involved. *Life Sciences*. 2019; 230:132-40.
  59. Tatli Seven P, Iflazoglu Mutlu S, Seven I, Arkali G, Ozer Kaya S, Kanmaz OE. Protective role of yeast beta-glucan on lead acetate-induced hepatic and reproductive toxicity in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 2021 May 25;28(38):53668–78.
  60. Kataba A, Nakayama SMM, Yohannes YB, Toyomaki H, Nakata H, Ikenaka Y, et al. Effects of zinc on tissue uptake and toxicity of lead in Sprague Dawley rat. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2021;83(11):1674–85.
  61. Wahab OA, Princely AC, Oluwadamilare AA, Oore-oluwapo DO, Blessing AO, Alfred EF. Clomiphene citrate ameliorated lead acetate-induced reproductive toxicity in male Wistar rats. *JBRA Assist Reprod*. 2019; 23(4): 336-43.

62. Sudjarwo SA, Sudjarwo GW, Koerniasari. . Res Pharm Sci. 2017;12(5): 381-90.
63. Rodak K, Kratz EM. PUFAs and Their Derivatives as Emerging Players in Diagnostics and Treatment of Male Fertility Disorders. Pharmaceuticals (Basel). 2023; 16(5): 723.
64. Korotkov SM. Mitochondrial Oxidative Stress Is the General Reason for Apoptosis Induced by Different-Valence Heavy Metals in Cells and Mitochondria. International Journal of Molecular Sciences. 2023; 24(19): 14459
65. Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2006;103(3):448-54.
66. Gonzales G, Nieto J, Rubio J, Gasco M. Effect of Black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. Andrologia. 2006; 38(5): 166-172
67. Gonzales GF, Vasquez VB, Gasco M. The transillumination technique as a method for the assessment of spermatogenesis using medicinal plants: the effect of extracts of black maca (*Lepidium meyenii*) and camu camu (*Myrciaria dubia*) on stages of the spermatogenic cycle in male rats. Toxicology Mechanisms and Methods. 2013; 23(8): 559-65.
68. Kelainy EG, Ibrahim Laila IM, Ibrahim SR. The effect of ferulic acid against lead-induced oxidative stress and DNA damage in kidney and testes of rats. Environ Sci Pollut Res. 2019; 26(31): 31675-84.
69. Braga-Vela J. Evolución metabólica y efecto antioxidante de camu camu y maca como nutraceuticos en jóvenes de 18 a 25 años de la amazonia peruana. Tesis para optar el grado de Doctor en Ciencias con mención en Fisiología, 2015.
70. Dzięcioł M, Wróblewska A, Janda-Milczarek K. Comparative Studies of DPPH Radical Scavenging Activity and Content of Bioactive Compounds in Maca (*Lepidium meyenii*) Root Extracts Obtained by Various Techniques. Applied Sciences. 2023; 13(8): 4827.
71. Lin L, Huang J, Sun-Waterhouse D, Zhao M, Zhao K, Que J. Maca (*Lepidium meyenii*) as a source of macamides and polysaccharide in combating of oxidative stress and damage in human erythrocytes. International Journal of Food Science & Technology. 2018; 53(2):304-12.
72. R S, S AD. Protective effect of *Abutilon indicum* against lead-induced reproductive toxicity in male Wistar rats. J Cell Biochem. 2019; 120(7):11196-205.

73. Undaryati YM, I'tishom R, Sudjarwo SA. Curcumin Protective Potential for the Seminiferous Tubules of Mice Treated with Lead Acetate. Trends in Sciences [Internet]. 2023 Jul 29 [cited 2024 Jul 19];20(10):6928–6928. Available from: <https://tis.wu.ac.th/index.php/tis/article/view/6928>
74. Bustos-Obregón Eduardo, del Río Fernando Costa, Sarabia Luis. Morphometric Analysis of Mice Testicular Tubules after Administration of Malathion and Maca. Int. J. Morphol. [Internet]. 2007 Jun [citado 2024 Feb 10] ; 25( 2 ): 245-248. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022007000200001>.
75. Fiette L, Slaoui M. Necropsy and Sampling Procedures in Rodents. En: Gautier JC, editor. Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2011 [citado el 18 de mayo de 2023]. p. 39–67. (Methods in Molecular Biology). Disponible en: [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_3).

# ANEXOS

## ANEXO 1. Flujograma del proceso experimental de conteo de espermatozoides

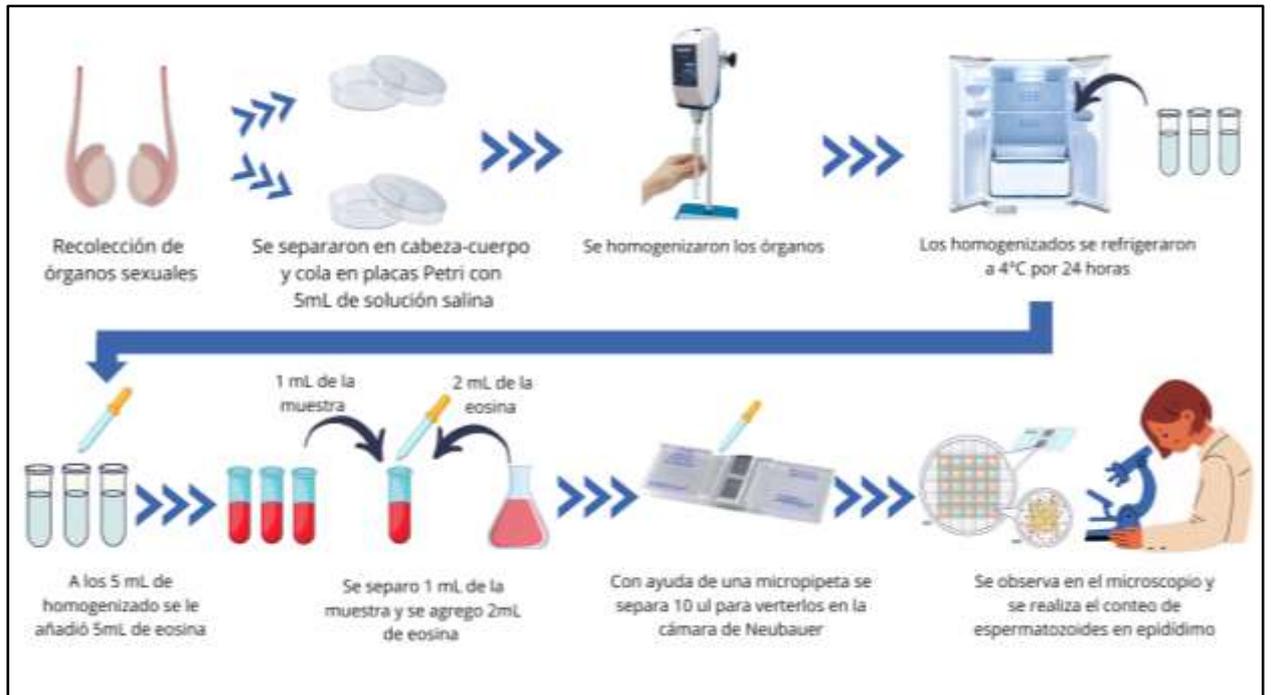


Figura 14. Flujograma del proceso de conteo de espermatozoides en epidídimo

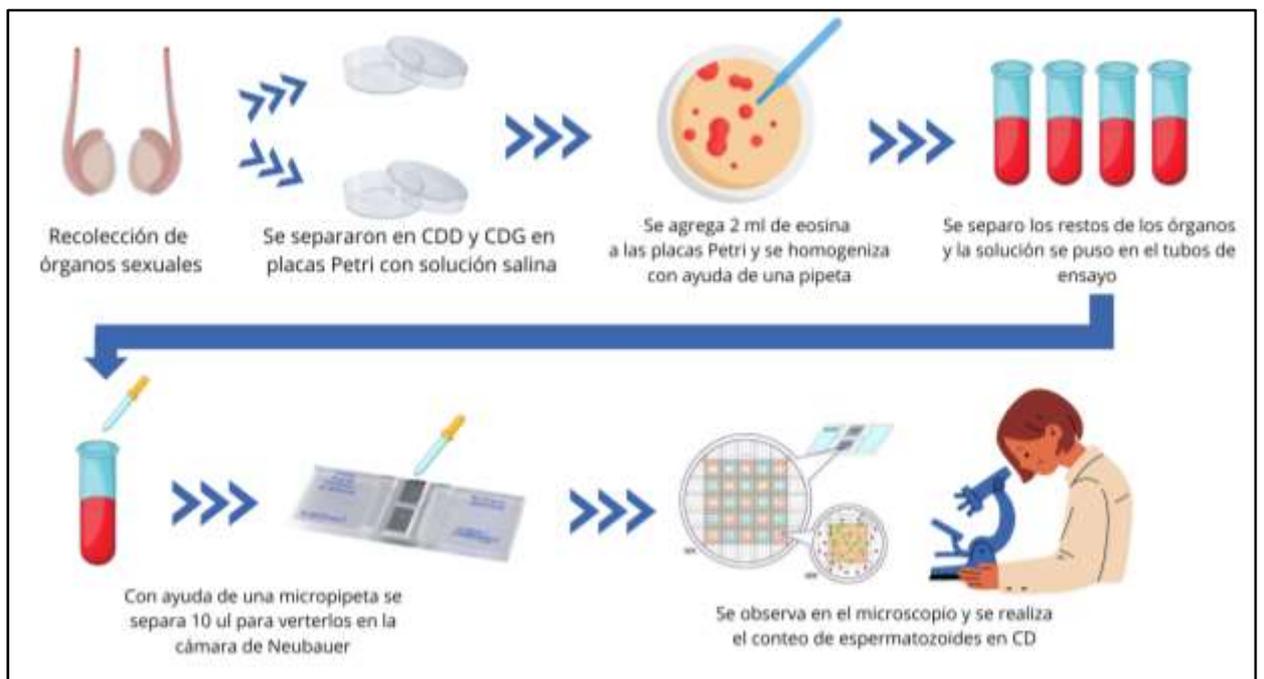


Figura 15. Flujograma del proceso de conteo de espermatozoides en conducto deferente

## ANEXO 2. Comando de Stata para la potencia estadística.

La potencia estadística es la probabilidad de que el análisis arroje una diferencia significancia entre las medias de los grupos. Un poder mayor e igual a 0.80, significa que hay 80% de probabilidad de detectar una significancia cuando esta existe. Se utilizo los datos del presente estudio y el comando de Stata. Donde la m1, m2, m3, m4, m5 y m6 representan las medias por grupo de la concentración de MDA, “n” significa el número total de animales experimentales que se obtuvieron. Y “varerror” representa la variabilidad de los datos dentro de los grupos, que se calcula como la suma de las diferencias al cuadrado entre cada observación y la media de su grupo correspondiente.

### Comando: power oneway m1 m2 m3 m4 m5 m6, n() varerror()

```
. power oneway 139.60 191.49 323.01 202.63 240.96 149.16, n(34) varerror (5340.214)
```

```
Estimated power for one-way ANOVA  
F test for group effect  
H0: delta = 0 versus Ha: delta != 0
```

```
Study parameters:
```

```
alpha = 0.0500  
N = 34  
delta = 0.8427  
N_g = 6  
m1 = 139.6000  
m2 = 191.4900  
m3 = 323.0100  
m4 = 202.6300  
m5 = 240.9600  
m6 = 149.1600  
Var_m = 3792.5940  
Var_e = 5340.2140
```

```
Actual sample sizes:
```

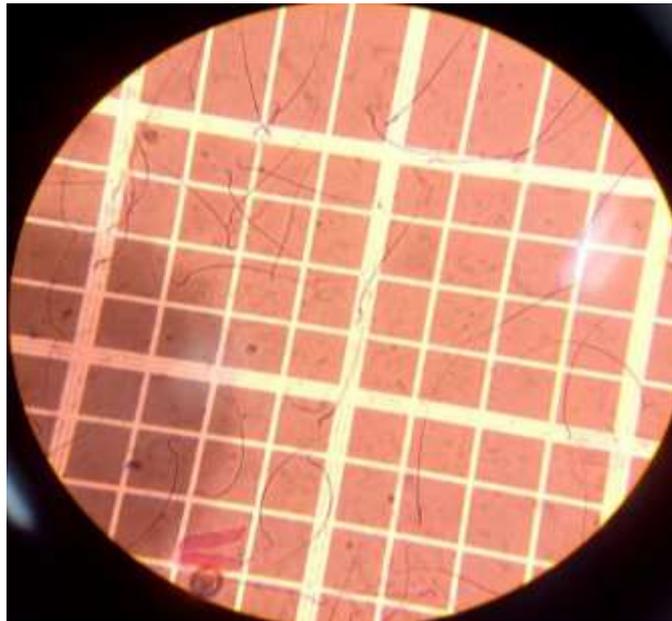
```
N = 30  
N per group = 5
```

```
Estimated power:
```

```
power = 0.9096
```

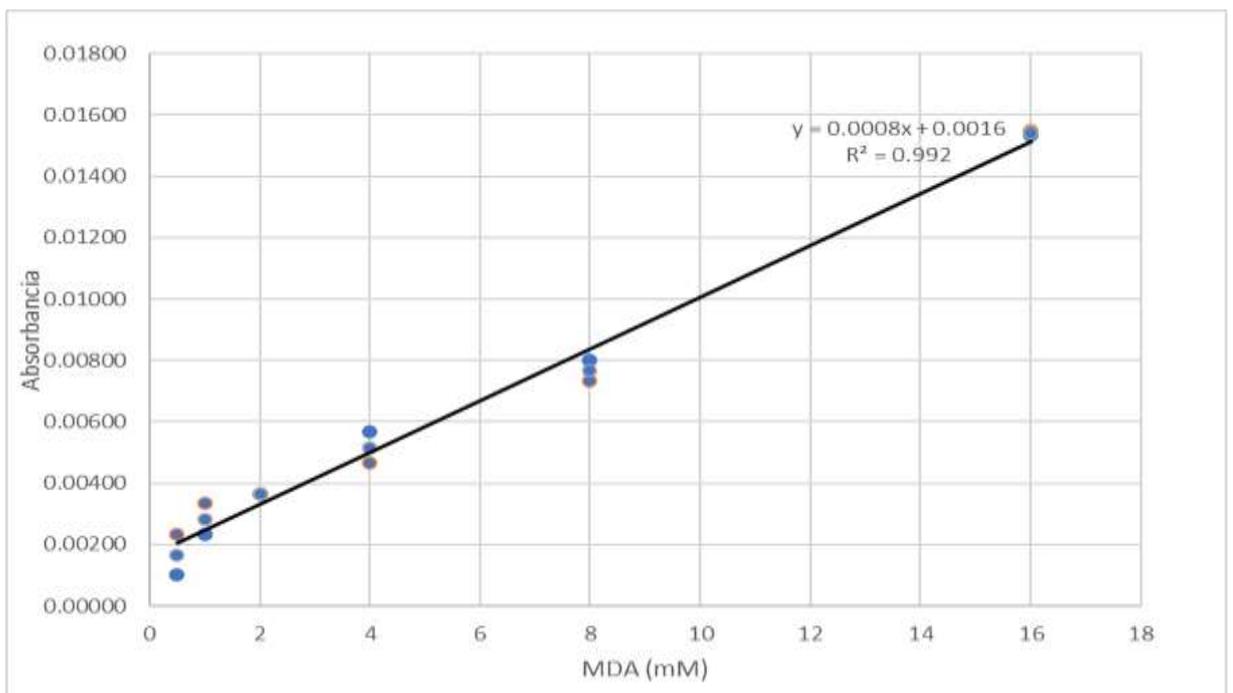
Se obtuvo una potencia de 0.909 (90%).

### ANEXO 3. Espermatozoides en cámara de Neubauer



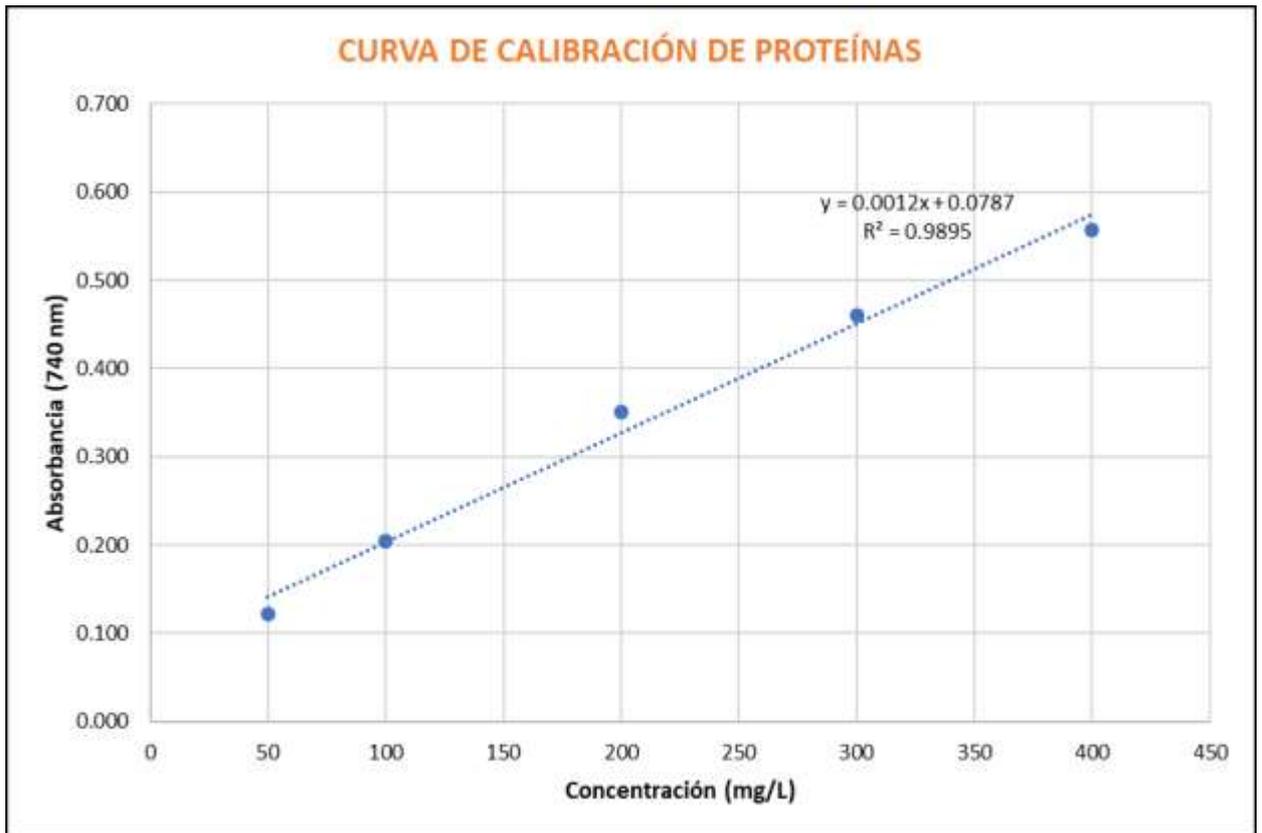
**Figura 16.** Conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer desde el microscopio a aumento 40X.

### ANEXO 4. Curva de MDA



**Figura 17.** Curvas estándar del malondialdehído (MDA). La figura muestra tres curvas estándar creadas en diferentes días. Se utilizó una concentración de 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 mM malondialdehído puro (99%). La absorbancia se midió por triplicado a 532 nm.

## ANEXO 5. Curva de Calibración de Proteínas



**Figura 18.** Curvas de calibración de proteínas. La absorbancia se midió por triplicado a 740 nm.

## ANEXO 6. Constancia de Aprobación del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA)



VICERRECTORADO  
DE INVESTIGACIÓN

### CONSTANCIA 016-04-23

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : "Efecto antioxidante de *Lepidium meyenii* (maca) sobre la espermatogénesis en ratas inducidas a estrés oxidativo por acetato de plomo".

Código de inscripción : 210833

Investigador(a) principal(es) : Guerrero Aliaga, Emelyn Lizbeth  
Holguino Puma, Sebastian Rodrigo

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

**Protocolo de investigación**, versión recibida en fecha 19 de mayo del 2023.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **28 de mayo del 2024**. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

*El presente proyecto de investigación sólo podrá iniciarse después de haber obtenido la(s) autorización(es) de la(s) institución(es) donde se ejecutará.*

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 29 de mayo del 2023.

  
  
Dr. Manuel Gasco Tantaclitco  
Presidente  
Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

/err.

Av. Honorio Delgado 430  
San Martín de Porres  
Apartado postal 4314  
319 0000 Anexo 201302  
vtrve@oficinas-igch.pe  
www.cayetano.edu.pe

## **ANEXO 7. Procedimiento para la necropsia.**

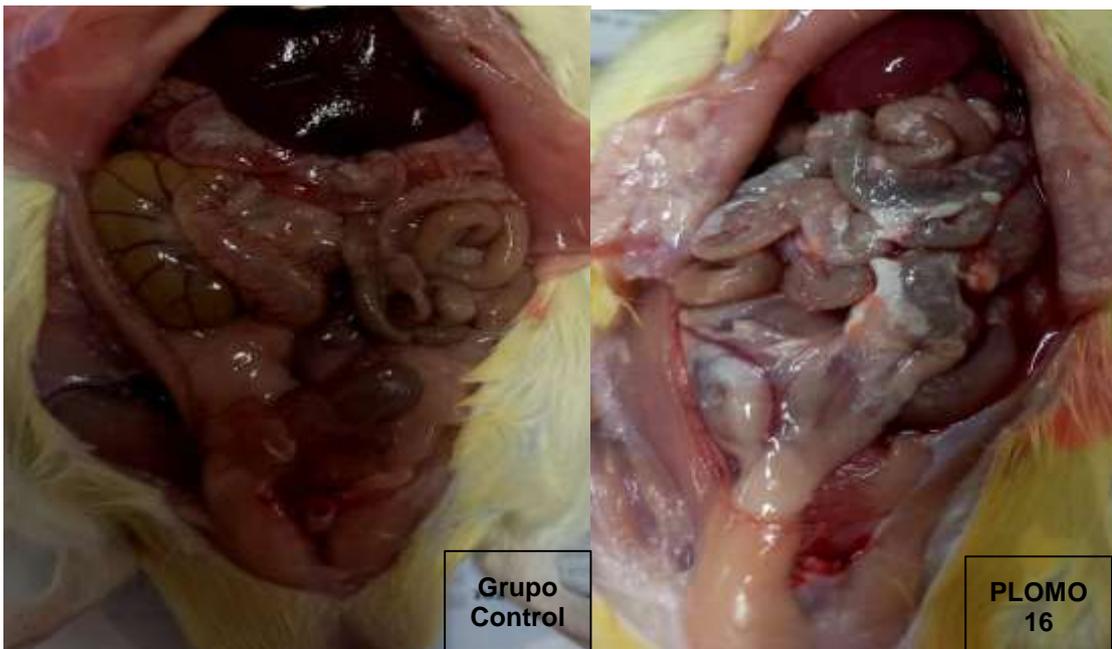
Una vez pasado el proceso de eutanasia, se procede con la necropsia [75]

- 1) Los animales experimentales se desinfectaron superficialmente con una solución de etanol al 95% y se secaron con papel absorbente. Luego, se colocó al animal, con el lado ventral hacia arriba, sobre una tabla de disección y sujetando firmemente las extremidades a la tabla.
- 2) Con una hoja de bisturí no. 12 se realizó una incisión longitudinal en la línea media ventral, a través de la piel, desde los genitales externos hasta la apófisis xifoides del esternón. Posteriormente, se agarró la piel de ambos lados de la incisión y tiró suavemente hacia afuera. Luego, se sujetó la pared abdominal con pinzas, cerca de la apófisis xifoides, y se levantó firmemente para permitir una pequeña incisión que permite la entrada de aire en el abdomen, facilitando que las vísceras se separen de la pared abdominal.
- 3) Se cortó la pared abdominal en la línea media con unas tijeras desde la pelvis hasta el apéndice xifoides, teniendo cuidado de no dañar ninguna víscera. Posteriormente, se tira la pared abdominal hacia los lados.
- 4) Se examina el peritoneo y se busca la presencia de cualquier contenido anormal, seguidamente, se comprueba la posición de los diferentes órganos. Los testículos se encuentran cubiertos por la túnica albugínea y son de color blanco grisáceo con una consistencia elásticas blanda.
- 5) Una vez identificado los testículos, se sujetarán los mismos por la grasa inguinal y se arreglarán junto con el epidídimo para evitar que se rompan, posteriormente, se cortaron los testículos lejos de las vísceras. En caso, los testículos estén en el escroto, se abrirá el mismo y se cortará los ligamentos fibrosos que anclan la cola del epidídimo al escroto. En adición, se cortan los conductos deferentes. Las muestras se reservaron para su posterior utilización.

**ANEXO 8. Evidencias fotográficas**



**Figura 19. Adaptación de animales experimentales**



**Figura 20. Toxicidad por acetato de plomo, Grupo Control vs Grupo PLOMO 16 mg/kg Ac Pb**