

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri”



*“Efectos de las fracciones del extracto metanólico de *Lepidium meyenii* (maca roja) en la Hiperplasia Prostática Benigna inducida con enantato de testosterona en ratas de la cepa Holtzman”*

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

Jorge Alexander Merino Rodríguez

Lima – Perú

2018

Asesora

PhD. Cynthia Gonzales Castañeda

PhD en investigación biomédica con especialidad en dermatoendocrinología y docente de fisiología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Co asesor

Dr. Gustavo Gonzales Rengifo

Jefe del Laboratorio de Endocrinología y Reproducción, Departamento de Ciencias Biológicas y Fisiológicas, Facultad de Ciencias y Filosofía, e Instituto de Investigaciones de la Altura. Universidad Peruana Cayetano Heredia

JURADO

Dra. Rosario Elena Rojas Duran

Presidenta

Lic. Giovanni Angelo Poletti Ferrara

Secretario

Dr. José Luis Aguilar Olano

Vocal

Dedicatoria

A Dios, mis padres Jorge y Dionicia, mi hermano Jhon y a Jorge Rojas,
gracias por ser mi soporte

AGRADECIMIENTOS

Existen muchas personas que contribuyeron a la elaboración de mi tesis, agradecer infinitamente a cada una de ellas

Agradezco a Dios por darme la sabiduría, paciencia y perseverancia en este largo caminar de la ciencia, gracias por reafirmarme mi camino como científico

A mis padres, Jorge Merino y Dionicia Rodriguez, por siempre confiar en mí, por brindarme el amor fraternal, por ser mi ejemplo a seguir y por su sacrificada labor en mi crianza, ¡Este título es para el orgullo de ustedes!

A mi hermano Jhon Merino, por ser un amigo y por permitirme crecer como persona y profesional, te quiero hermano!

A los integrantes del laboratorio de Endocrinología y Reproducción por las enseñanzas y anécdotas compartidas, especialmente al Círculo de Investigación en Plantas medicinales con efecto en salud por el apoyo en la realización de esta tesis.

Al Dr. Gustavo Gonzales, mi maestro y guía en el campo científico de la reproducción, por enseñarme a ver más allá de lo que otros no ven.

A la Dra. Cynthia Gonzales, por su asesoramiento y paciencia para poder llegar a la meta.

Al Dr. Manuel Gasco, por su entrenamiento y apoyo en la parte experimental de mi tesis.

A Jorge Rojas, por ser mi apoyo, inspiración, mi fuerza y mi complemento perfecto, por ser paciente y enseñarme la definición perfecta del amor: todo lo puede, todo lo lucha, todo lo logra. Te amo hoy y siempre, gracias por estar a mi lado apoyándome en este largo proceso, ¡ya llegamos a la meta y este logro es nuestro!

A Liz Sanchez, por tu compañía y perfecta amistad en estos largos años de la universidad, gracias por creer en mí y darme ánimos siempre.

Gracias a la vida por esta gran oportunidad

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiado por FONDECYT a través del Círculo de Investigación en Plantas con efectos en Salud.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCION	-	-	-	-	-	-	1
	1.1.	Anatomía de la próstata humana						
	1.2.	Próstata de la rata						
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	-	-					3
	2.1	Pregunta de investigación						
	2.2	Hipótesis						
III.	OBJETIVOS	-	-	-	-	-	-	4
	3.1	Objetivos generales						
	3.2	Objetivos específicos						
IV.	Materiales y Métodos	-	-	-	-	-	-	5
	4.1	Primer experimento						
	4.1.1	Animales experimentales						
	4.1.2	Preparación de las dosis						
	4.2	Segundo experimento						
	4.2.1	Animales experimentales						
	4.2.2	Preparación de las dosis						
	4.3	Administración de los extractos						
	4.4	Sacrificio de los animales de estudio						
	4.5	Evaluación morfológica e histológica						
	4.6	Análisis estadístico						
V.	RESULTADOS	-	-	-	-	-	-	12
	5.1	Primer experimento						
	5.1.1	Pesos corporales						
	5.1.2	Pesos prostáticos y vesiculares						
	5.1.3	Altura epitelial prostática						
	5.1.4	Área estromal						
	5.2	Segundo experimento						
	5.2.1	Pesos corporales						

5.2.2 Pesos prostáticos y vesiculares

5.2.3 Altura epitelial prostática

5.2.4 Área estromal

VI.	DISCUSIÓN	-	-	-	-	-	-	34
VII.	CONCLUSIONES	-	-	-	-	-	-	38
VIII.	SUGERENCIAS	-	-	-	-	-	-	38
IX.	REFERENCIAS	-	-	-	-	-	-	39

Resumen

INTRODUCCIÓN: Estudios previos han determinado la disminución del efecto del enantato de testosterona en la formación de la Hiperplasia prostática benigna (HPB) en modelos animales mediante la administración del extracto atomizado de maca roja. Sin embargo, existe una controversia por saber en qué fracción se encuentra el efecto biológico sobre la HPB.

El objetivo del presente estudio es determinar el efecto dosis respuesta de las fracciones del extracto metanólico sobre la próstata en el modelo de HPB.

MÉTODOS: Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Holtzman las cuales fueron inducidas a generar HPB mediante la administración de dos dosis de enantato de testosterona (ET; 10 mg en total, día 1 y día 7). Para el primer experimento, los animales fueron divididos en 7 grupos con 5 ratas por grupo. Cada grupo recibió el siguiente tratamiento, (1) finasteride, (2) extracto hidroalcohólico de maca roja, (3) extracto metanólico de maca roja, (4) fracción butanólica de maca roja y (5) fracción acuosa de maca roja. En el segundo experimento se obtuvieron 9 grupos con 6 ratas por grupo: Metanólico Dosis 1 (MET D1), metanólico dosis 2 (MET D2), Metanólico Dosis 3 (MET D3), Acuoso Dosis 1 (AQ D1), Acuoso Dosis 2 (AQ D2), Acuoso dosis 3 (AQ D3), Butanólico Dosis 1 (BUT D1), Butanólico Dosis 2 (BUT D2) y Butanólico Dosis 3 (BUT D3). Los tratamientos fueron administrados por 21 días consecutivos de forma oral. Se tiene como control negativo al grupo que se le administro agua y como control positivo al grupo ET. Terminado el tratamiento los animales fueron sacrificados de forma humanitaria y se obtuvieron los órganos reproductivos para análisis.

RESULTADOS: Se obtuvo un incremento significativo del tamaño de la próstata y vesícula seminal del grupo ET respecto al control. Asimismo, el tratamiento con la fracción butanólica presentó un mayor efecto reduciendo la altura epitelial y el área estromal en la HPB a comparación de la fracción acuosa; además, a una mayor dosis se puede evidenciar un mejor efecto respecto a la altura epitelial y el área estromal.

CONCLUSIONES: La fracción butanólica del extracto metanólico de hipocótilos de maca roja permite conservar significativamente la altura epitelial y el área estromal respecto a los otros tratamientos.

Palabras clave: Maca roja, Hiperplasia Prostática Benigna, Próstata.

Abstract

INTRODUCTION: Previous studies have determined the decrease of the effect of testosterone enanthate in the formation of benign prostatic hyperplasia (BPH) in animal models by administering the atomized extract of red maca. However, there is a controversy to know in what fraction the biological effect on BPH is found.

The objective of the present study is to determine the dose response effect of the methanolic extract fractions on the prostate in the BPH model.

METHODS: Adult male rats of the Holtzman strain were used to induce BPH by administering two doses of testosterone enanthate (ET, 10 mg total, day 1 and day 7). For the first experiment, the animals were divided into 7 groups with 5 rats per group. Each group received a treatment, which were (1) finasteride, (2) hydroalcoholic extract of red maca, (3) methanolic extract of red maca, (4) butanolic fraction of red maca and (5) aqueous fraction of red maca. In the second experiment, there were 9 groups with 6 rats per group: Methanolic Dose 1 (MET D1), methanolic dose 2 (MET D2), Methanolic Dose 3 (MET D3), Aqueous Dose 1 (AQ D1), Aqueous Dose 2 AQ D2), Aqueous Dose 3 (AQ D3), Butanolic Dose 1 (BUT D1), Butanolic Dose 2 (BUT D2) and Butanol Dose 3 (BUT D3). The treatments were administered for 21 consecutive days orally. The group that was given water is the negative control and the ET group is a positive control. After the treatment, the animals were sacrificed in a humane way and the reproductive organs were obtained for analysis.

RESULTS: A significant increase of the prostate and seminal vesicle weights was observed in the ET group respect to values in the control group. It was also found that the treatment with the butanolic fraction has a greater effect by reducing the epithelial height and the stromal area in the BPH compared to the aqueous fraction. In addition to a higher dose a better effect can be evidenced with respect to the epithelial height and the stromal area..

CONCLUSIONS: The butanolic fraction of the methanolic extract of hypocotyls of red maca makes it possible to significantly preserve the epithelial height and the stromal area with respect to the other treatments.

Keywords: Red Maca, benign prostatic hyperplasia, prostate

INTRODUCCIÓN

La Hiperplasia Prostatica Benigna (HPB) es considerada una patología asociada al envejecimiento (Reznicek, 2000) que genera una compresión de la uretra prostática restringiendo el flujo de orina desde la vejiga ocasionando problemas en el tracto urinario (Kapoor A, 2012). El crecimiento prostático es multifactorial y respecto al componente hormonal, los andrógenos en conjunto con los estrógenos estimulan el estroma prostático generando un aumento en el número de receptores de andrógenos favoreciendo la formación de dihidrotestosterona (DHT) y colágeno, alterando la apoptosis y contribuyendo al desarrollo de la HPB (Cunha *et al*, 2001).

Un medicamento utilizado comúnmente para bloquear el mecanismo de acción de esta patología es el finasteride, inhibidor de la 5 α reductasa 2 que es la enzima encargada de la conversión de testosterona en dihidrotestosterona (Gao *et al*, 2004). Sin embargo, el costo asociado a este medicamento es sustancial debido a los efectos secundarios que presenta respecto a los parámetros reproductivos (disminución del peso vesicular e impotencia sexual) (Zeliadt *et al*, 2005), por esta razón se han buscado alternativas en base a productos naturales para solucionar este problema (Talpur *et al*, 2003).

Uno de los mejores candidatos es *Lepidium meyenii* (Maca), una planta altoandina que crece entre los 4000 a 4500 msnm perteneciente a la familia de las Brassicaceae (Gonzales *et al*, 2001). La maca presenta 13 ecotipos por el color externo de su hipocótilo que van del blanco al negro (Tello *et al*, 1992) y cada variedad presenta diferentes propiedades (Gonzales *et al*, 2005). Entre una de estas variedades se encuentra la maca roja (MR), que ha demostrado reducir significativamente el tamaño de la próstata en ratas con hiperplasia prostática inducida con enantato de testosterona (ET) (Gonzales *et al*, 2005; Gonzales *et al*, 2007; Gasco *et al*, 2007). En efecto, la MR reduce el peso de la próstata con un efecto de tipo dosis-respuesta sin ningún cambio en los niveles de testosterona ni del peso de la vesícula seminal (Gasco *et al*, 2007; Gonzales *et al*, 2007).

La finalidad de este proyecto de investigación es encontrar la fracción del extracto metanólico de hipocótilos de maca roja que presenta el efecto biológico para revertir el patrón de HPB y descubrir si existe algún efecto dosis respuesta mediante la administración de los diferentes tratamientos de maca roja.

1.1. Anatomía de Próstata Humana

La próstata es una glándula en forma de nuez que forma parte del aparato reproductor masculino, rodea a la uretra en el cuello vesical y presenta dos o más lóbulos (Hellstrom, 2006). La próstata aporta el 30% del líquido

seminal y es el órgano blando con mayor concentración de zinc en el organismo (Zaichick *et al*, 1997).

Según su anatomía, la próstata se divide en 3 zonas: la zona periférica, la zona central y la zona de transición.

La zona periférica es la subdivisión anatómica de mayor tamaño. Está compuesta por tejido secretor que contiene 75% de tejido glandular, en esta zona predomina la neoplasia. En la rata, el equivalente a esta zona son los lóbulos prostáticos dorsales y laterales, zona donde también predomina la neoplasia similar al humano (Siler *et al*, 2005).

La zona central constituye el 25% de la masa glandular total de la próstata. Esta zona está rodeada de los conductos eyaculadores. Esta zona se diferencia de las demás por las características glandulares tanto morfológicas como histológicas.

La zona de transición corresponde al 5% restante de la próstata. Está formado por un conjunto de conductos que proceden de un mismo punto en la unión entre los segmentos proximal y distal de la uretra. Esta es la principal región donde se origina la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) (Prakash *et al*, 2002).

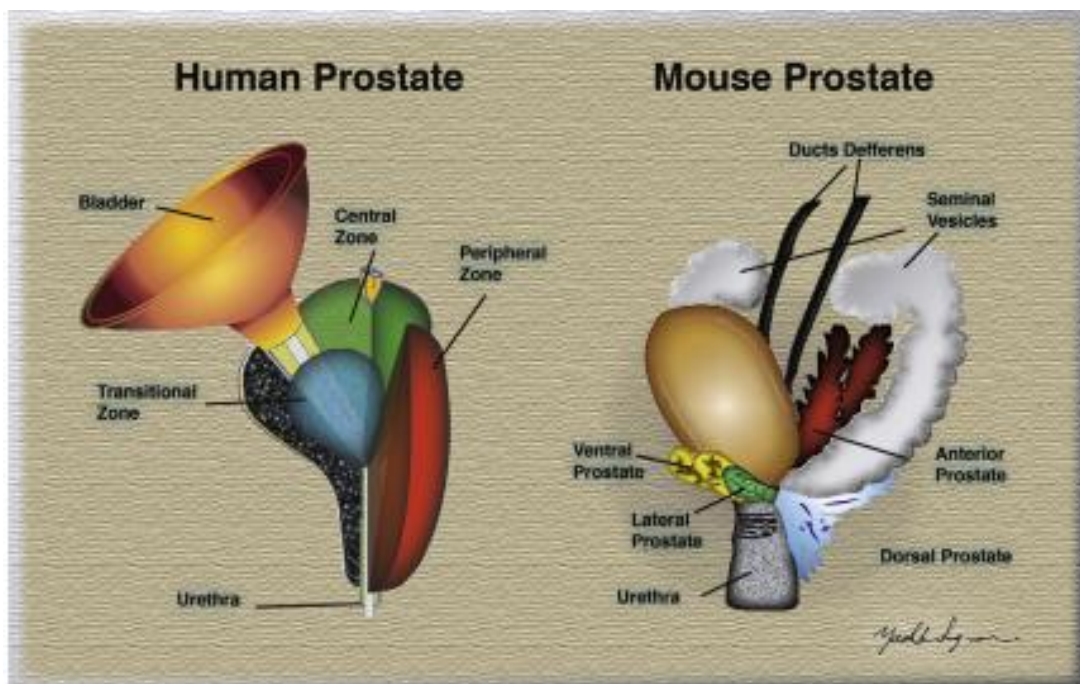


Figura1 : Estructura de la próstata humana y del ratón. (Izquierda) Diagrama de una próstata humana adulta que muestra la uretra y la vejiga en relación con las tres principales regiones glandulares de la próstata según lo descrito por McNeal, 1981: zona central, zona periférica y zona de transición. (Derecha) Diagrama que representa los cuatro lóbulos prostáticos principales de la próstata del ratón, la rata tiene una organización similar: próstata lateral, próstata dorsal, próstata ventral y próstata anterior. (Sugimira *et al*, 1984)

1.2. Próstata de Rata

La próstata de ratas está comprendida por 4 lóbulos: ventral, anterior (llamado también coagulante), dorsal y lateral. Estos lóbulos se encuentran alrededor de la uretra y muestran ramificación ductal y producción de proteínas secretoras (Jesik et al, 1982).

Sin embargo, la próstata humana carece de arquitectura lobular definida y presenta zonas con distinta predisposición a enfermedades: el carcinoma se desarrolla principalmente en la zona periférica y la hiperplasia benigna en la zona de transición (McNeal, 1981). Además, la zona periférica humana es análoga a la del lóbulo dorsolateral del roedor debido a las observaciones de los tumores inducidos en próstata de roedores localizados en este lóbulo (Greenberg et al, 1995; Berteaux et al, 2004)

La histología de la próstata comprende un componente glandular y otro componente no glandular, ambos fusionados y dentro de una cápsula prostática. La interacción entre estos dos componentes es importante en el proceso de la morfogénesis, diferenciación y respuesta hormonal de la próstata (Amalinei, 2006).

2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Pregunta de Investigación

Pregunta 1: ¿La administración de la fracción butanólica reduce en mayor grado la HPB en comparación al extracto metanólico y la fracción acuosa de maca roja?

Pregunta 2: ¿Existe un efecto dosis-dependiente en la respuesta al extracto metanólico de maca roja y sus fracciones butanólica y acuosa?

2.2. Hipótesis

Hipótesis 1: La administración de la fracción butanólica de maca roja reduce la formación de la Hiperplasia Benigna Prostática inducida por enantato de testosterona, con un efecto mayor al observado con la administración de la fracción acuosa.

Hipótesis 2: La administración de la fracción butanólica de maca roja tiene un efecto dosis respuesta reduciendo a formación de Hiperplasia Prostática Benigna inducida por el enantato de testosterona en comparación con la fracción acuosa.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivos generales

- Determinar los efectos de las diferentes concentraciones del extracto metanólico de hipocótilos de maca roja y sus fracciones butanólica y acuosa en la HPB inducida por ET en ratas adultas de la cepa Holtzman.
- Determinar el efecto dosis respuesta de las diferentes fracciones de maca roja sobre el patrón inflamatorio ocasionado por la administración de enantato de Testosterona (ET) al inducir Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) en ratas adultas de la cepa Holtzman.

3.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de las fracciones butanólica y acuosa de maca roja en el peso de la próstata y vesículas seminales en ratas tratadas con enantato de testosterona.
2. Determinar el efecto de las fracciones butanólica y acuosa de maca roja en grosor epitelial prostática en ratas tratadas con enantato de testosterona.
3. Determinar el efecto de las fracciones butanólica y acuosa de maca roja en el área estromal en ratas tratadas con enantato de testosterona.
4. Comparar el efecto del extracto metanólico versus el efecto de las fracciones butanólica y acuosa en los parámetros macroscópicos y microscópicos del tejido prostático en ratas tratadas con enantato de testosterona (ET).
5. Determinar el efecto de los tratamientos dosis respuesta de las fracciones de maca roja en la altura epitelial prostática en ratas tratadas con enantato de testosterona.
6. Determinar el efecto de los tratamientos dosis respuesta de las fracciones de maca roja en el área estromal en ratas tratadas con enantato de testosterona

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Endocrinología y Reproducción de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima – Perú.

Los animales fueron inducidos a hiperplasia prostática a través de la administración intramuscular de enantato de testosterona (ET) en 35 ratas macho de la cepa Holtzman de 3 meses de edad. Los animales recibieron dos dosis de ET, una dosis el día 1 y una segunda dosis el día 7 (83 mg/kg por dosis). 1 semana después de la 2da inyección se empieza a administrar el tratamiento por 21 días. La eficacia de la hiperplasia prostática benigna inducida por ET se evidencia luego de los 21 días de tratamiento (Con el sacrificio del animal, después de los 35 días de iniciado el estudio) (Gasco M, 2014).

4.1. PRIMER EXPERIMENTO

4.1.1. Animales experimentales

Se obtuvieron ratas machos de la cepa Holtzman de 3 meses de edad con pesos de 300 g, agrupados en 7 grupos, cada grupo con 5 ratas (Tabla 1)

Tabla 1: Grupo de Tratamientos y Concentración de dosis a administrar:

TRATAMIENTO	Abreviatura	Producto original	Concentración mg/kg/día
Control	Control	Agua	1 ml
Enantato de Testosterona	ET	ET	83 mg/kg
ET + finasteride	ET-F	ET + Finasteride	83 mg/kg + 0.7 mg/kg
ET + Extracto atomizado de maca roja	ET-MR STD	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 267 mg/kg
ET+ Extracto metanólico de maca roja	ET-MET	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 430 mg/kg
ET + Fracción butanólica de maca roja	ET-BUT	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 47.3 mg/kg
ET + Fracción acuosa de maca roja	ET-AQ	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 382.7 mg/kg

Se tiene como control negativo al agua y como control positivo al ET.

4.1.2. Preparación de las dosis

i) Extracto atomizado de Maca Roja Estándar

Se utilizó el producto comercial peruano de Maca Roja Atomizada de la marca “Juvens” que contiene 3 g de extracto hidroalcohólico atomizado de hipocótilos de maca roja. Cada sobre fue disuelto en 37.5 mL de agua destilada y luego fue congelado hasta su posterior uso.

La concentración usada en ratas (de 300 g de peso) que ha demostrado tener efectos biológicos es de 80 mg/mL (Gasco, 2014; Gonzales C, 2013). Esta concentración corresponde a una dosis de 267 mg/kg de peso. Esto extrapolado al humano (de 70 kg aproximadamente) y corregido por la tasa metabólica (Reagan-Shaw et al, 2007, “Dose translation from animal to human studies revisited”) nos da la dosis de 43.13 mg/kg, según la ecuación:

Dosis equivalente en humanos (mg/kg) = Dosis animal (mg/kg) x (km animal/km humano)

Km rata = 6 ; km humano = 37

Dosis equivalente en humanos (mg/kg) = 267 (mg/kg) x (6/37) = 43.29 mg/kg

Para una persona de 70 kilos a 43.29 x 70 = 3.030 g.

Se administró 1 mL por 21 días consecutivos.

ii) Finasteride

Se administró por vía intramuscular (im) una dosis de 0.7 mg/kg de finasteride de acuerdo a Gasco et al, 2007. Posteriormente la muestra fue congelada hasta su uso y se administró 1 ml por un total de 21 días consecutivos.

iii) Extractos metanólico, y fracciones butanólica y acuosa.

Dos kg de hipocótilos secos molidos de maca roja fueron macerados en 6 litros de metanol por 5 días a 45 °C mediante agitación continua. Luego de la maceración, se procedió al proceso de filtración en donde se obtuvo el primer extracto metanólico y un residuo de este filtrado. Este residuo del filtrado fue lavado nuevamente con otros 4 litros de metanol por un día a 45 °C y luego fue sometido a agitación para finalmente pasar por un segundo proceso de filtración obteniéndose un segundo extracto metanólico y un segundo residuo del filtrado.

Estos 2 extractos metanólicos forman parte del “pool de extractos metanólicos” que pasaron por el rotavapor para evaporar el solvente y remover el metanol tóxico de los productos obtenidos. El rotavapor trabaja a 55 grados C°, temperatura cercana a la T° de ebullición del metanol (64.7°), logrando extraer la mayor cantidad de metanol. Luego al quedar un residuo, se coloca en una estufa a 45°C por 6h hasta que salga totalmente el metanol quedando solamente el extracto. Se obtuvo 307 g de extracto metanólico, el cual se utilizó en su totalidad para extraer con 500 ml de agua y 500 ml de butanol las fracciones acuosas y butanolicas, usando peras para la separación de las fracciones, , ambas fracciones pasaron nuevamente por el rotavapor obtener las fracciones de trabajo para su posterior uso. de este fraccioamiento se obtuvo 32.37 g de fracción butanólica y 261.73 g de fracción acuosa.

Se obtuvo 307 g de extracto metanólico, a esta cantidad se le disminuye el peso de la fracción butanólica (32.37 g) y de la fracción acuosa (261.73) obteniéndose 12.9 g de extracto metanólico que se disuelve en 100 ml obteniendo 0.13 g/ml que dividido entre el peso promedio del animal (0.3 kg) resulta la dosis de 0.43 mg/kg

Luego, la dosis de la fracción butanólica (11% de extracto metanólico) fue de 47.3 mg/kg y de la fracción acuosa (89% del extracto metanólico) es 382.7 mg/kg

Se administró 1 ml por cada tratamiento por vía oral usando una sonda orogástrica durante 21 días ininterrumpidos.

4.2. SEGUNDO EXPERIMENTO

4.2.1. Animales experimentales

En este segundo experimento se utilizaron 69 ratas macho de la cepa Holtzman de 3 meses de edad con pesos de 300 g, agrupados en 12 grupos, cada uno con 6 ratas (Tabla 2)

Tabla 2: Grupo de Tratamientos y Concentración de dosis a administrar:

TRATAMIENTO	Abreviatura	Producto original	Concentración mg/kg/día
Control	Control	Agua	1 ml
Enantato de Testosterona	ET	ET	83 mg/kg
ET + finasteride	ET-F	ET + Finasteride	83 mg/kg + 0.7 mg/kg
ET+Extracto Metanólico Dosis 1 de Maca Roja	MET D1	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 43 mg/kg
ET+Extracto Metanólico Dosis 2 de Maca Roja	MET D2	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 430 mg/kg
ET+Extracto Metanólico Dosis 3 de Maca Roja	MET D3	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 4.3 gr/kg
ET+ Fracción Acuosa Dosis 1 de Maca Roja	AQ D1	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 38.27 mg/kg
ET+ Fracción Acuosa Dosis 2 de Maca Roja	AQ D2	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 382.7 mg/kg
ET+ Fracción Acuosa Dosis 3 de Maca Roja	AQ D3	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 3.82 g/kg
ET+ Fracción Butanólica Dosis 1 de Maca Roja	BUT D1	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 4.73 mg/kg
ET+ Fracción Butanólica Dosis 2 de Maca Roja	BUT D2	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 47.3 mg/kg
ET+ Fracción Butanólica Dosis 3 de Maca Roja	BUT D3	ET + Maca roja de Junín	83 mg/kg + 473 mg/kg

Se tiene como control negativo al grupo que se le administro agua y como control positivo al grupo con ET

4.2.2. Preparación de la dosis

Para la preparación de las diferentes dosis se tuvo en cuenta la dosis del extracto metanólico del experimento 1 (Concentración para la Dosis 2). Con este dato, se realizaron los cálculos para obtener 3 concentraciones diferentes para el 2do experimento. Estas concentraciones fueron 10 veces menos que la inicial (para la Dosis 1) y 10 veces más que la inicial (para la Dosis 3)

A) Extracto Metanólico

La dosis inicial del extracto metanólico fue de 430 mg/kg. Esta concentración se utilizó para la preparación de los demás tratamientos

A.1) Metanólico Dosis 1

El cálculo de este tratamiento fue 10 veces menos que la dosis inicial (430 mg/kg) resultando 43 mg/kg. Luego esta dosis se dividió entre el peso del animal (300 g) y el volumen a inocular donde se obtuvo 0.013 g/ml de extracto metanólico.

A.2) Metanólico Dosis 2

El cálculo de este tratamiento fue el mismo que la dosis inicial (430 mg/kg). Luego esta dosis se dividió entre el peso del animal (300 g) y el volumen a inocular obteniéndose 0.13 g/ml de extracto metanólico.

A.3) Metanólico Dosis 3

El cálculo de este tratamiento fue 10 veces más que la dosis inicial (430 mg/kg) resultando 4.3 g/kg. Luego esta dosis se dividió entre el peso del animal (300 g) y el volumen a inocular donde se obtuvo 1.3 g/ml de extracto metanólico.

B) Fracción Acuosa

La dosis inicial de la fracción acuosa fue de 382.7 mg/kg. Esta dosis se utilizó para la preparación de los demás tratamientos

B.1) Acuoso Dosis 1

El cálculo de este tratamiento fue 10 veces menos que la dosis inicial (382.7 mg/kg) resultando 38.27 mg/kg. Luego esta dosis se dividió entre el peso del animal (300 g) y el volumen a inocular donde se obtuvo 12.75 mg/ml de la fracción acuosa.

B.2) Acuoso Dosis 2

El cálculo de este tratamiento fue el mismo que la concentración inicial (382.7 mg/kg). Luego esta concentración se dividió entre el peso del animal (300 g) y el volumen a inocular donde se obtuvo 127.5 mg/ml de la fracción acuosa.

B.3) Acuoso Dosis 3

El cálculo de este tratamiento fue 10 veces más que la concentración inicial (382.7 mg/kg) resultando 3.82 g/kg. Luego esta concentración se dividió entre el peso del animal (300 g) y el volumen a inocular donde se obtuvo 1.27 gr/ml de fracción acuosa

C). Fracción Butanólica

La dosis inicial de la fracción butanólica fue 47.3 mg/kg. Esta concentración se utilizó para la preparación de los demás tratamientos

C.1) Butanólico Dosis 1

El cálculo de este tratamiento fue 10 veces menos que la concentración inicial (47.3 mg/kg) resultando 4.73 mg/kg. Luego esta concentración se dividió entre el peso del animal (300 g) y el volumen a inocular donde se obtuvo 1.57 mg/ml de fracción butanólica.

C.2) Butanólico Dosis 2

El cálculo de este tratamiento fue el mismo que la dosis inicial (47.3 mg/kg). Luego esta dosis se dividió entre el peso del animal (300 g) y el volumen a inocular donde se obtuvo 15.7 mg/ml de extracto metanólico.

C.3) Butanólico Dosis 3

El cálculo de este tratamiento fue 10 veces más que la dosis inicial (47.3 mg/kg) resultando 473 mg/kg. Luego esta dosis se dividió entre el peso del animal (300 g) y el volumen a inocular donde se obtuvo 157 mg/ml de fracción acuosa

4.3. Administración de los extractos y fracciones

Los diversos tratamientos fueron administrados por vía oral durante 21 días, una semana después de la segunda dosis de ET utilizando una sonda orogástrica. Como grupo referencial se tuvo al control negativo (agua) y al control positivo (finasteride).

Antes de iniciar los tratamientos los pesos corporales fueron registrados.

4.4. Sacrificio de los animales de estudio

Los animales fueron sacrificados 24 horas después del último día de tratamiento (día 21) mediante inhalación de CO₂. Se extrajeron los órganos reproductivos tales como los testículos, epidídimos, vesículas seminales, próstata ventral y glándula prepucial.

4.5. Evaluación morfológica e Histológica

Se registró el peso fresco de cada órgano y se procedió a colocar las muestras en formol al 10%, luego se procedió a colocar en etanol al 70% para el respectivo estudio histológico (Robert *et al*, 2010).

Luego, se extrajo uno de los dos lóbulos de la próstata ventral y una mitad de la vesícula seminal, los cuales fueron colocados en solución Bouin durante 24 horas. Luego de este tiempo, la solución fue retirada y reemplazada por etanol al 70% y se prepararon diversos bloques de parafina de 5 mm de espesor. La tinción fue realizada con Hematoxilina & Eosina (H&E).

El análisis de las láminas fue realizada a ciegas, es decir el material estaba codificado de una manera que se desconozca el grupo de tratamiento al cual pertenecen las láminas. Las observaciones fueron realizadas en un microscopio óptico (Leica DM1000) a diferentes aumentos: 400X para observar estructuras de tejido epitelial y conectivo y 1000X para observar los diferentes tipos de células, estructurales. Las imágenes de las diferentes estructuras fueron capturadas con la ayuda de una cámara incorporada (Leica ICC50, Richmond, BC, Canadá) al microscopio y a un computador donde se observaron las imágenes. Las láminas fueron leídas por el autor de la tesis.

4.6. Análisis estadístico

Los datos son presentados con medias y su respectiva desviación estándar. Para ello se usó el paquete estadístico SPSS para Windows (versión 22.0). El análisis estadístico de los datos se realizó con ANOVA para una prueba de 2 vías. La diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un $p < 0.05$.

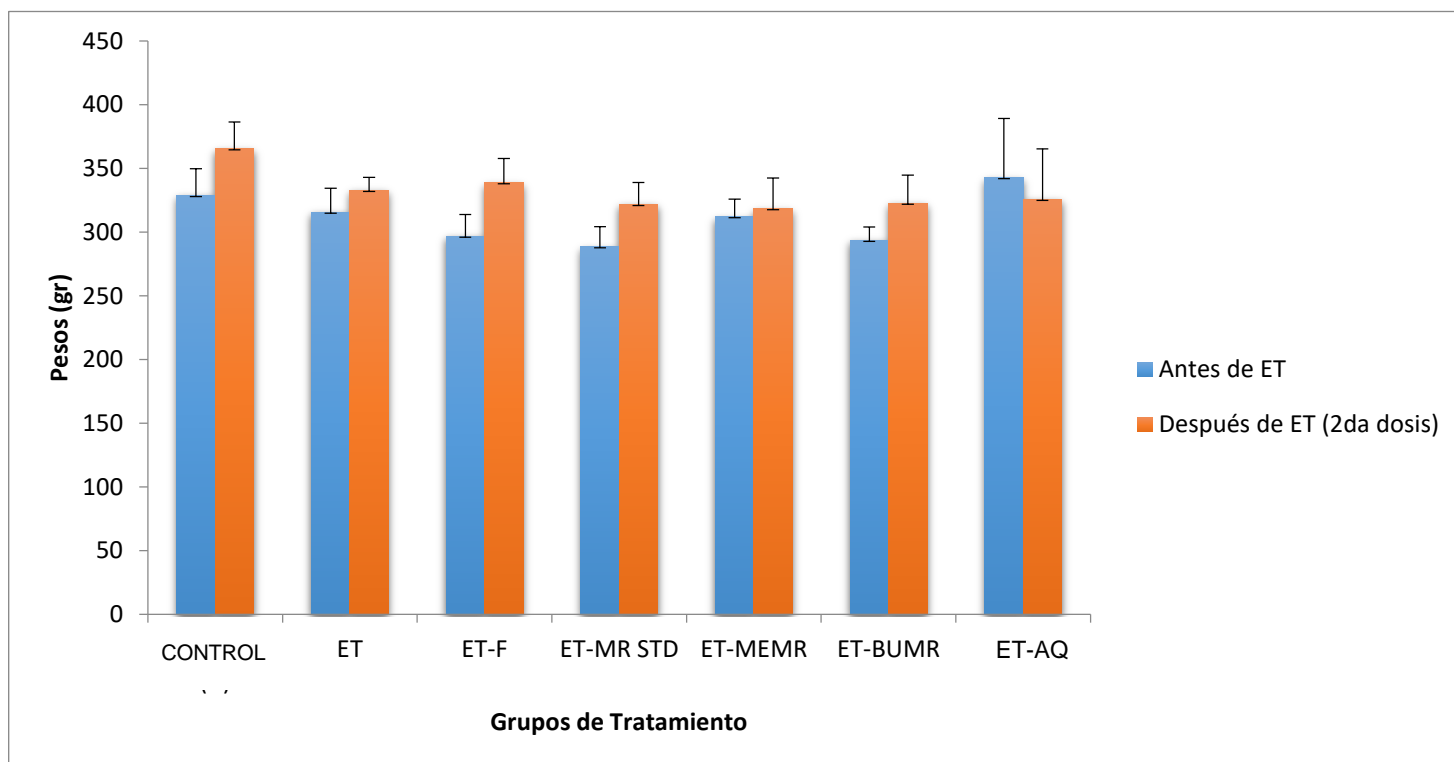
V. RESULTADOS

5.1. Primer experimento

5.1.1. Pesos Corporales

El peso de las 35 ratas fue controlado antes y después de la administración intramuscular de enantato de testosterona (ET). Las ratas fueron pesadas el día cero (antes de la 1era inyección de ET) y el día 7 (luego de la 2da inyección de ET) y se realizó un análisis comparativo para verificar si existe alguna variación en el peso corporal por la administración del ET para inducir HPB. Los pesos de las 35 ratas de cepa Holtzman fueron aproximadamente 300 gr en promedio antes de la inyección de ET, luego de la 2da inyección se vio un incremento en el peso en todos los grupos excepto en el grupo acuoso. (Gráfico 1)

Gráfico 1: Pesos corporales promedios (g) antes y después de la administración de Enantato de Testosterona (ET) en ratas Holtzman. Los grupos son: Control (C) enantato de testosterona (ET), ET + Finasteride (ET-F) y los diferentes tratamientos con las fracciones de maca roja: Maca Roja Estándar (ET-MR STD), Extracto metanólico de maca roja (ET-MET), Fracción butanólica de Maca Roja (ET-BUT) y fracción acuosa de maca roja (ET-AQ).



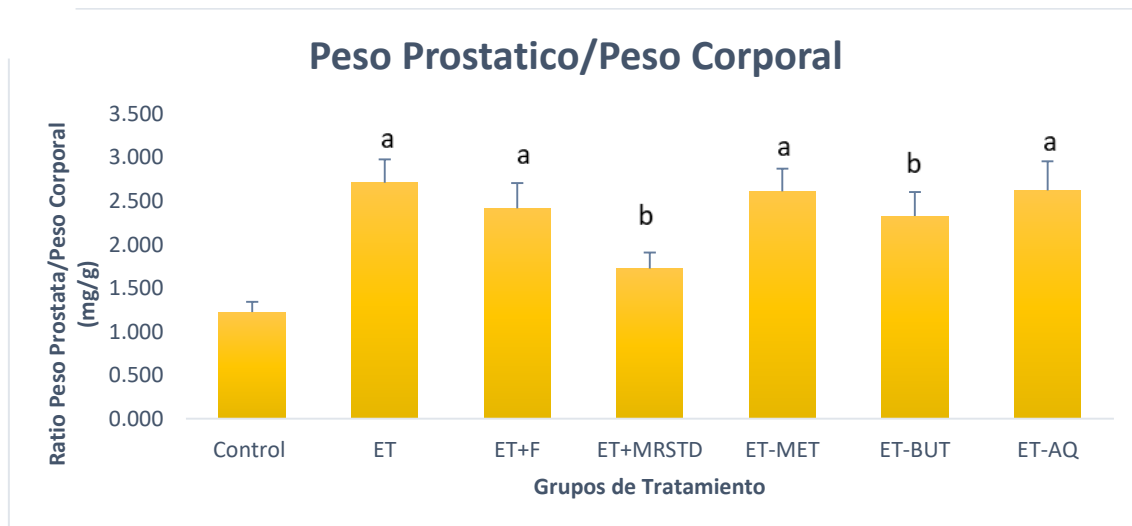
Los animales fueron distribuidos aleatoriamente y la alimentación fue ad libitum. No existe una diferencia significativa entre los pesos de las ratas antes y después de la inyección intramuscular de enantato de testosterona (ET) en los 7 grupos de tratamiento, además no se evidencia un aumento en el grupo acuoso. Sin embargo, se puede evidenciar un aumento de peso en el grupo control. (Grupo sin administración de ET) indicando que el aumento de peso corporal no es un efecto directo de la testosterona.

5.1.2. Pesos prostáticos y vesiculares

5.1.2.1. Pesos prostáticos

El tratamiento por 21 días con enantato de testosterona produce un aumento significativo ($p < 0.05$) del peso de la próstata con respecto al Control. Por otro lado, el tratamiento con Finasteride logra reducir significativamente el incremento del peso prostático inducido por ET ($P < 0.05$). Entre los tratamientos con maca roja se observa que el tratamiento con el extracto de maca roja estándar así como con la fracción butanólica logran disminuir el peso de la próstata significativamente ($p < 0.05$) respecto al grupo ET (Grafico 2).

Gráfico 2: Peso de próstata (mg) de 35 ratas (7 grupos) post tratamiento (21 días): Control (C), Enantato de Testosterona (ET), ET + Finasteride (ET-F), Maca Roja Estándar (ET-MR STD), Extracto metanólico de maca roja (ET-MET), Fracción butanólica de Maca Roja (ET-BUT) y fracción acuosa de maca roja (ET-AQ). ^aP<0.05 respecto al Control, ^bP<0.05 respecto al Grupo ET

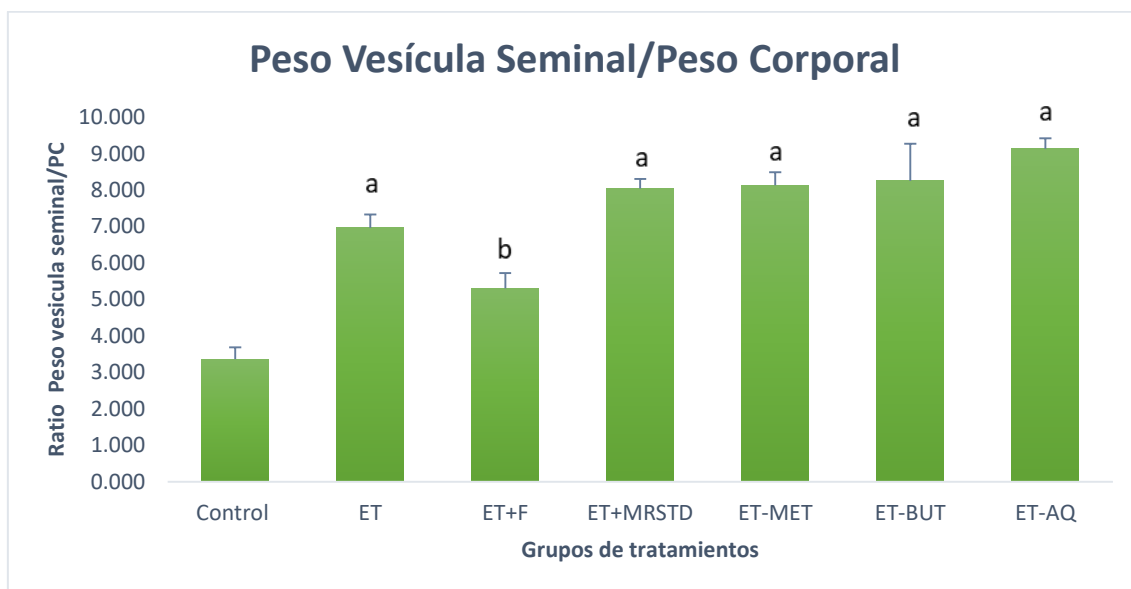


5.1.2.2. Pesos vesiculares

El peso de la vesícula seminal es casi el doble en todos los grupos excepto en el grupo tratado con Finasteride, el cual tiene un efecto significativo sobre el peso de la vesícula seminal ($P<0.05$).

No se observa ningún efecto por parte de ninguna fracción de maca usada. No existen diferencias entre el control y el ET-F (Gráfico 3). El Finasteride si es efectivo en evitar el incremento del peso de la vesícula.

Gráfico 3: Peso de vesícula seminal (g) de 35 ratas (7 grupos) post tratamiento: Control (C) (V) 1ml de agua, Enantato de Testosterona (ET), ET + Finasteride (ET-F) y los diferentes tratamientos de maca roja: Maca Roja Estándar (ET-MR STD) , Extracto metanólico de maca roja (ET-MET), Fracción butanólica de Maca Roja (ET-BUT) y fracción acuosa de maca roja (ET-AQ). ^aP<0.05 respecto al Control, ^bP<0.05 respecto al Grupo ET



5.1.3. Altura epitelial prostática

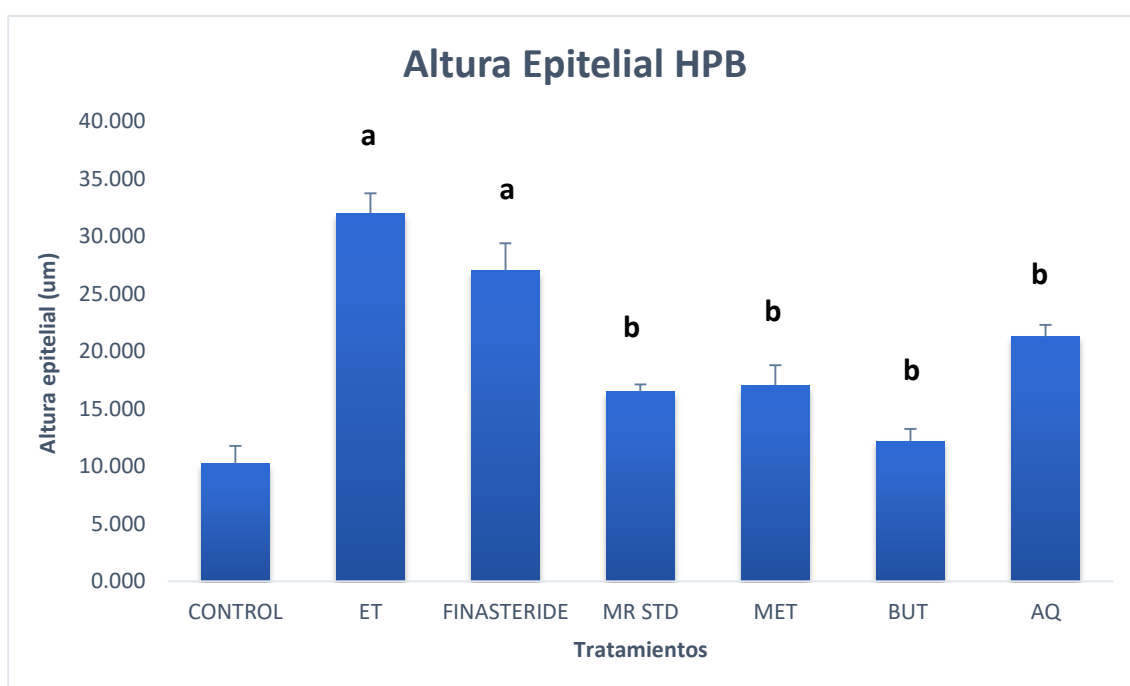
El tratamiento por 21 días con ET produjo un incremento significativo de la altura epitelial prostática respecto al grupo Control demostrando de esta manera que sí se produjo la hiperplasia prostática benigna (Tabla 3).

Tabla 3: Valores de la altura epitelial prostática de acuerdo a los grupos de experimentación luego de 21 días de tratamiento. Los valores son media \pm error estándar. ^aP<0.05 respecto al Control, ^bP<0.05 respecto al Grupo ET.

Grupo	Altura epitelial prostática (<i>um</i>)
Control	10.207 \pm 1.553
ET	32.011 \pm 1.721 ^a
ET+F	27.024 \pm 2.382 ^a
ET+MRSTD	16.501 \pm 0.619 ^b
ET+MET	17.038 \pm 1.739 ^b
ET+BUT	12.187 \pm 1.071 ^b
ET+AQ	21.276 \pm 1.018 ^b

Cada lámina fue dividida en 4 zonas y por cada zona se realizaron 50 mediciones de altura epitelial haciendo un total de 200 mediciones, de esta manera se estaría abarcando toda el área prostática. Las mediciones fueron realizadas a 400X utilizando el microscopio Leica. Los resultados presentados indican que sí existe un incremento en la altura epitelial prostática y que los tratamientos con Maca Roja presentan efecto en la disminución de la altura prostática incrementada por el efecto de la administración im del ET (Gráfico 4)

Gráfico 4: Altura epitelial prostática de 35 ratas (7 grupos): Control (C), Enantato de Testosterona (ET), ET + Finasteride (ET-F) y los diferentes tratamientos de maca roja: Maca Roja Estándar (ET-MR STD) , Extracto metanólico de maca roja (ET-MET), Fracción butanólica de Maca Roja (ET-BUT) y fracción acuosa de maca roja (ET-AQ). ^aP<0.05 respecto al Control, ^bP<0.05 respecto al Grupo ET



Por otro lado, se puede evidenciar microscópicamente el efecto de los diferentes tratamientos para revertir el patrón del incremento de la altura epitelial en la HPB disminuyendo este patrón de diferente manera, evidenciando un mejor efecto en los tratamientos con maca roja. La flecha señala el epitelio prostático (Gráfico 5).

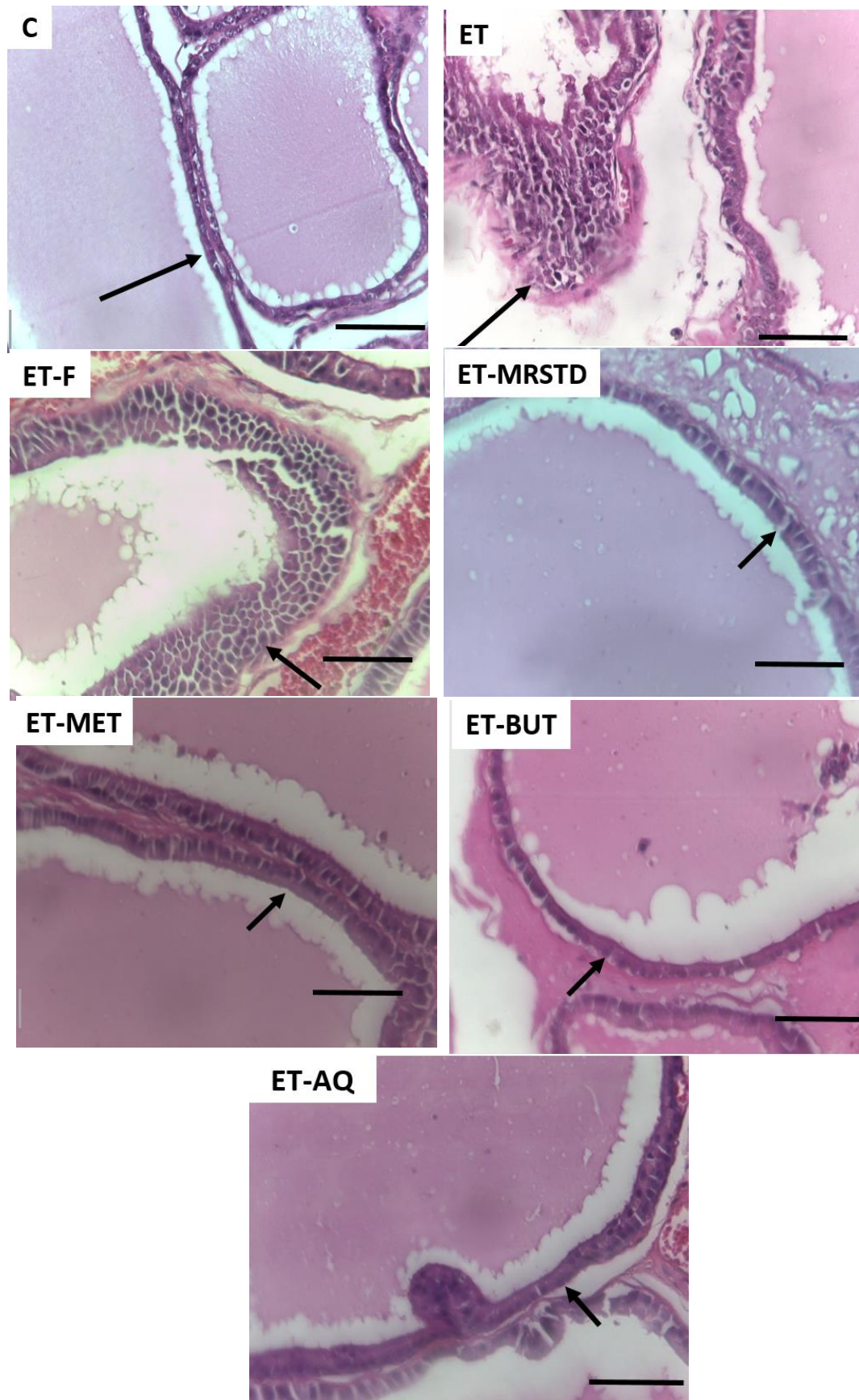


Gráfico 5: Microfotografías de tejido prostático de los 7 grupos (V, ET, ET+F, ET+MRSTD, ET+MET, ET+BUT, ET+AQ) realizado en el microscopio óptico Leica DM 1000. La escala de barra negra es de 20 μ m y una magnificación de 400X. Tinción H&E. La flecha indica el epitelio prostático en los diferentes tratamientos y la variación depende del efecto de cada tratamiento. Se hicieron 200 mediciones por lámina.

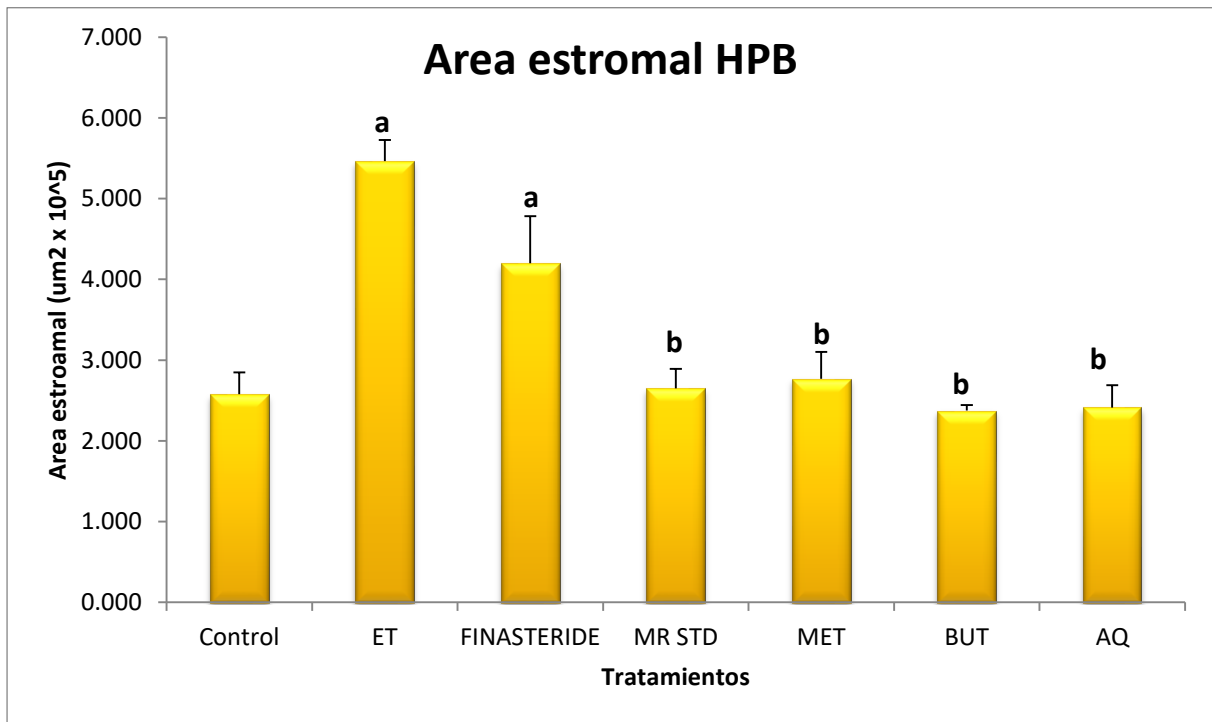
5.1.4. Área estromal

El tratamiento por 21 días con ET produjo un incremento significativo del área estromal prostática respecto al grupo Control demostrando de esta manera que sí se produjo la hiperplasia prostática benigna y los tratamientos con maca roja revierten este patrón (Tabla 4).

Tabla 4: Valores del área estromal prostática de acuerdo a los grupos de experimentación luego de 21 días de tratamiento. Los valores son media \pm error estándar. ^aP<0.05 respecto al Control, ^bP<0.05 respecto al Grupo ET.

Grupo	Área estromal prostática ($\times 10^5 \mu m^2$)
Control	2.578 \pm 0.271
ET	5.465 \pm 0.260 ^a
ET+F	4.199 \pm 0.583 ^a
ET+MRSTD	2.649 \pm 0.243 ^b
ET+MET	2.769 \pm 0.331 ^b
ET+BUT	2.374 \pm 0.069 ^b
ET+AQ	2.411 \pm 0.278 ^b

Grafico 6: Área estromal prostática de 35 ratas (7 grupos): Control (C), Enantato de Testosterona (ET), ET + Finasteride (ET-F) y los diferentes tratamientos de maca roja: Maca Roja Estándar (ET-MR STD), Extracto metanólico de maca roja (ET-MET), Fracción butanólica de Maca Roja (ET-BUT) y fracción acuosa de maca roja (ET-AQ). ^aP<0.05 respecto al Control, ^bP<0.05 respecto al Grupo ET



Por cada lámina histológica de tejido prostático se realizaron 4 mediciones, de esta manera se estaría abarcando toda el área prostática. Las mediciones fueron realizadas a 100X utilizando el microscopio Leica. Los resultados presentados indican que si existe un incremento en el área estromal prostática y que los tratamientos con Maca Roja presentan efecto en la disminución del área estromal incrementada por el efecto de la administración im del ET (Gráfico 6)

Asimismo, se puede evidenciar microscópicamente el efecto de los diferentes tratamientos para revertir el patrón del incremento del área estromal en la HPB disminuyendo este patrón (por la mayor presencia de acinos prostáticos) de diferente manera, evidenciando un mejor efecto en los tratamientos con maca roja. (Gráfico 7).

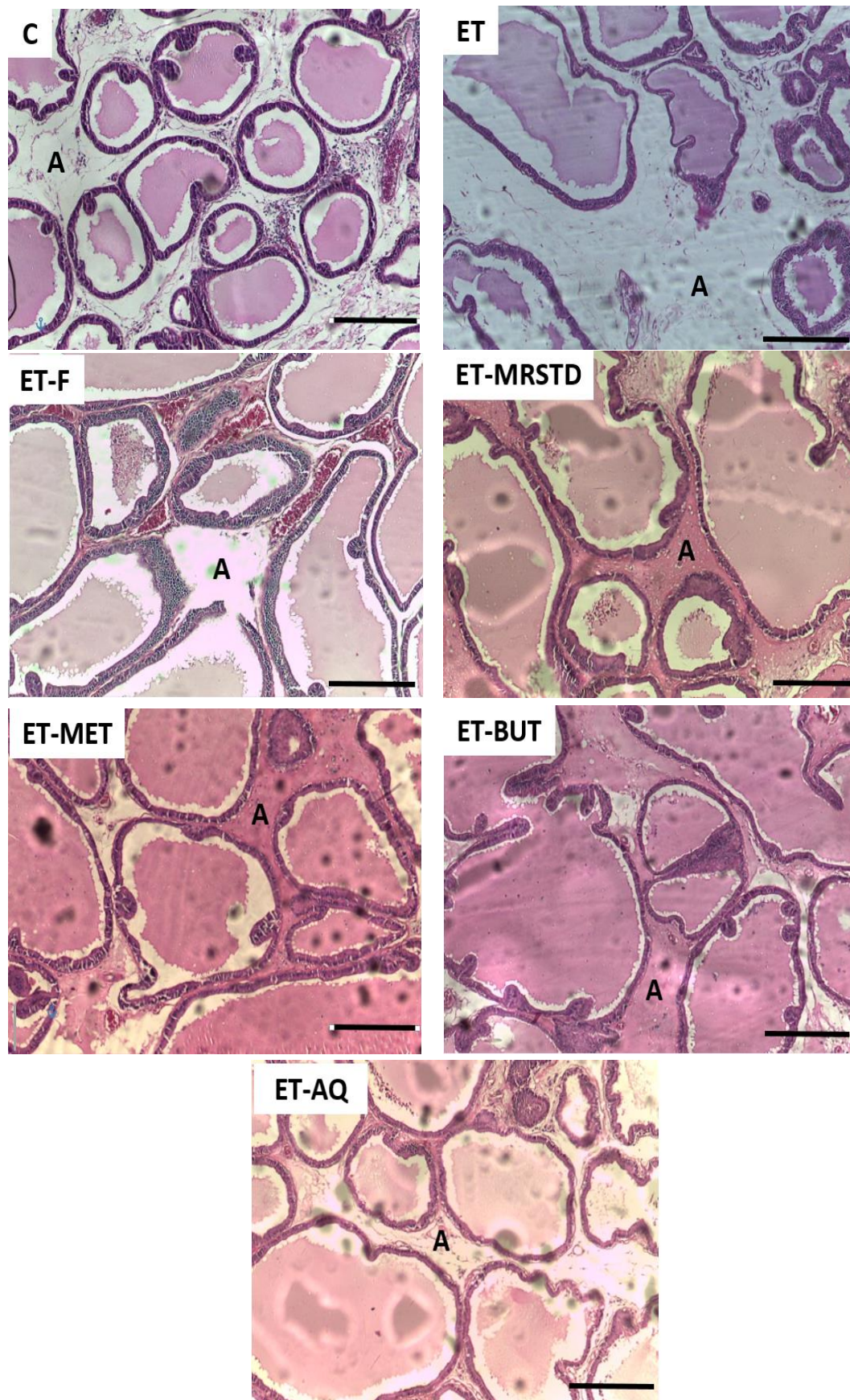


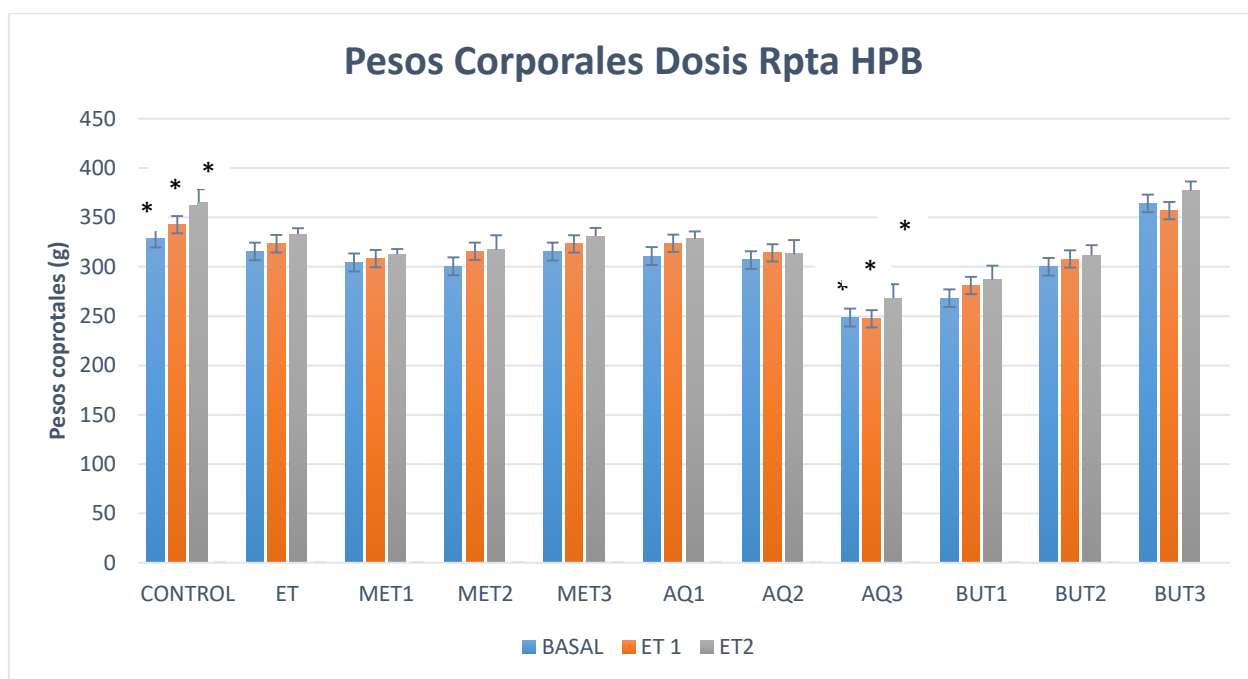
Gráfico 7: Microfotografías de tejido prostático de los 7 grupos (V, ET, ET+F, ET+MRSTD, ET+MET, ET+BUT, ET+AQ) realizado en el microscopio óptico Leica DM 1000. La escala de la barra negra es de 80 μm y una magnificación de 100X. Tinción H&E. La letra A indica el estroma prostático en los diferentes tratamientos y la variación depende del efecto de cada tratamiento. Se hicieron 4 mediciones por lámina.

5.2. Segundo experimento

5.2.1. Pesos corporales

El peso de las 54 ratas fue controlado antes y después de la administración intramuscular de enantato de testosterona (ET). Las ratas fueron pesadas el día cero (antes de la 1era inyección de ET) y el día 7 (luego de la 2da inyección de ET) y se realizó un análisis comparativo para verificar si existe alguna variación en el peso corporal por la administración del ET para inducir HPB. Los pesos de las 54 ratas de cepa Holtzman son aproximadamente en promedio 300 g antes de la inyección de ET, luego de la 2da inyección se ve un incremento en el peso en todos los grupos con una ligera diferencia en el grupo Acuoso Dosis 2. (Gráfico 7).

Gráfico 8: Pesos corporales promedios (gr) antes y después de la administración de Enantato de Testosterona (ET) en ratas Holtzman. Los grupos son: Metanólico Dosis 1 (MET D1), Metanólico Dosis 2 (MET D2), Metanólico Dosis 3 (MET D3), Acuoso Dosis 1 (AQ D1), Acuoso Dosis 2 (AQ D2), Acuoso Dosis 3 (AQ D3), Butanólico Dosis 1 (BUT D1), Butanólico Dosis 2 (BUT D2) y Butanólico Dosis 3 (BUT D3).



*ANOVA para una vía: $p < 0.05$

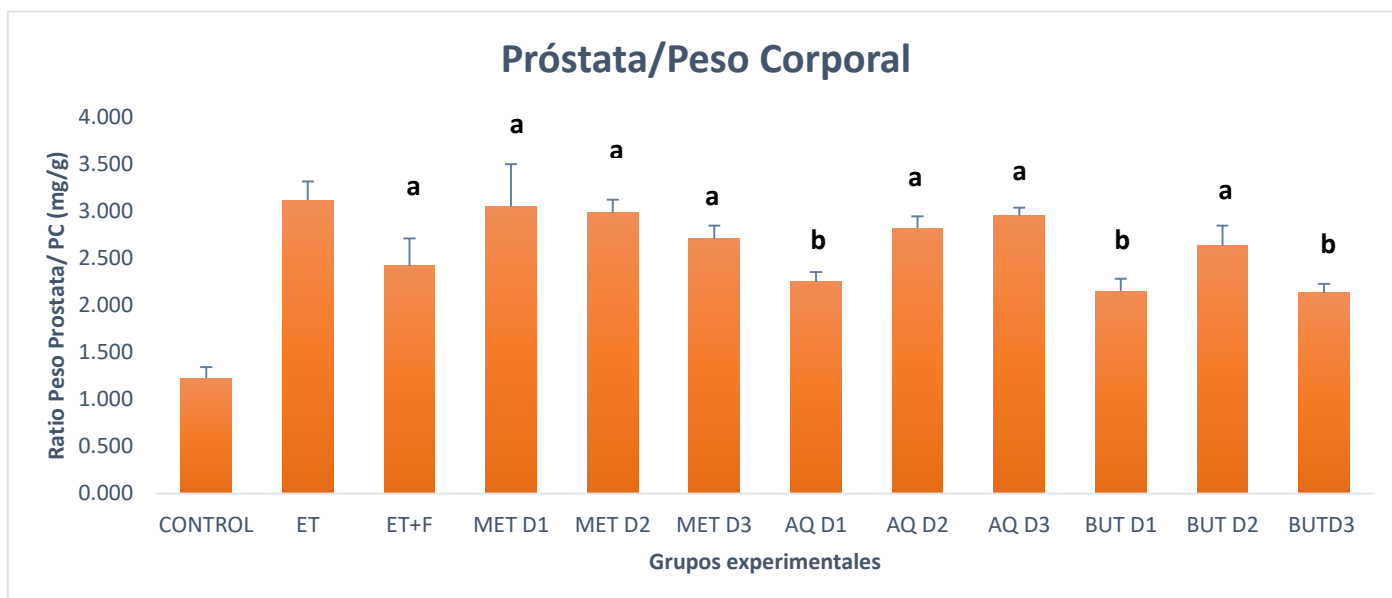
Existe una variación entre los pesos de las ratas antes y después de la inyección intramuscular de enantato de testosterona (ET) en el grupo control y el grupo AQ D3. Estos 2 grupos presentan diferencia significativa, sin embargo esto no se evidencia en los otros tratamientos con maca.

5.2.2. Pesos prostáticos y vesiculares

5.2.2.1. Pesos prostáticos

El tratamiento por 21 días origino un aumento en el peso prostático. Los diferentes tratamientos con maca roja metanólico, acuosa y butanólica presentan diferentes patrones: Para el extracto metanólico, a mayor dosis disminuye el valor del peso prostático/peso corporal. Caso contrario sucede con la fracción acuosa: A mayor dosis aumenta este valor del peso prostático/peso corporal. Sin embargo en la fracción butanólica no presenta un patrón fijo: la primera dosis presenta un menor valor, en la segunda dosis aumenta y a la tercera dosis disminuye el valor del peso prostático/peso corporal, esto resultados nos indica que no existe una diferencia entre la concentración de la dosis y el peso prostático. Sin embargo, al observar el grafico se evidencia que el grupo butanólico sigue presentando el menor peso prostático, especialmente el grupo BUT D3.

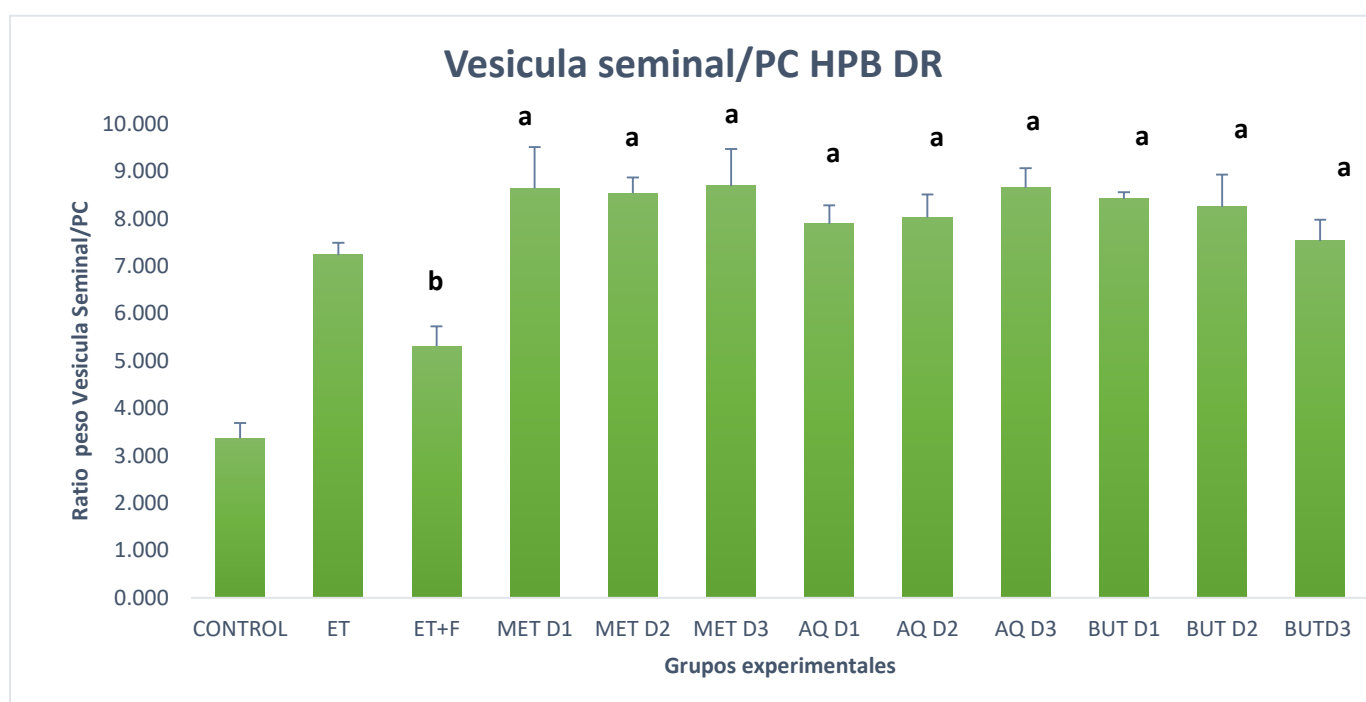
Gráfico 9: Peso de próstata (gr) de 69 ratas (12 grupos) post tratamiento (21 días): Los grupos son: Control, Enantato de testosterona (ET), ET + Finasteride (ET-F), Metanólico Dosis 1 (MET D1), Metanólico Dosis 2 (MET D2), Metanólico Dosis 3 (MET D3), Acuoso Dosis 1 (AQ D1), Acuoso Dosis 2 (AQ D2), Acuoso Dosis 3 (AQ D3), Butanólico Dosis 1 (BUT D1), Butanólico Dosis 2 (BUT D2) y Butanólico Dosis 3 (BUT D3). ^aP<0.05 respecto al Control, ^bP<0.05 respecto al Grupo ET



5.2.2.2. Pesos vesiculares

No existe diferencia significativa entre los tratamientos con maca a diferentes dosis respecto al ET. Pero, existe diferencia significativa entre el Finasteride y el ET ($P < 0.05$)

Gráfico 10: Peso seco de vesícula seminal (gr) de 69 ratas (12 grupos) post tratamiento: Los grupos son: Control, Enantato de testosterona (ET), ET + Finasteride (ET-F), Metanólico Dosis 1 (MET D1), Metanólico Dosis 2 (MET D2), Metanólico Dosis 3 (MET D3), Acuoso Dosis 1 (AQ D1), Acuoso Dosis 2 (AQ D2), Acuoso Dosis 3 (AQ D3), Butanólico Dosis 1 (BUT D1), Butanólico Dosis 2 (BUT D2) y Butanólico Dosis 3 (BUT D3). ^a $P < 0.05$ respecto al Control, ^b $P < 0.05$ respecto al Grupo ET



5.2.3. Altura epitelial prostática

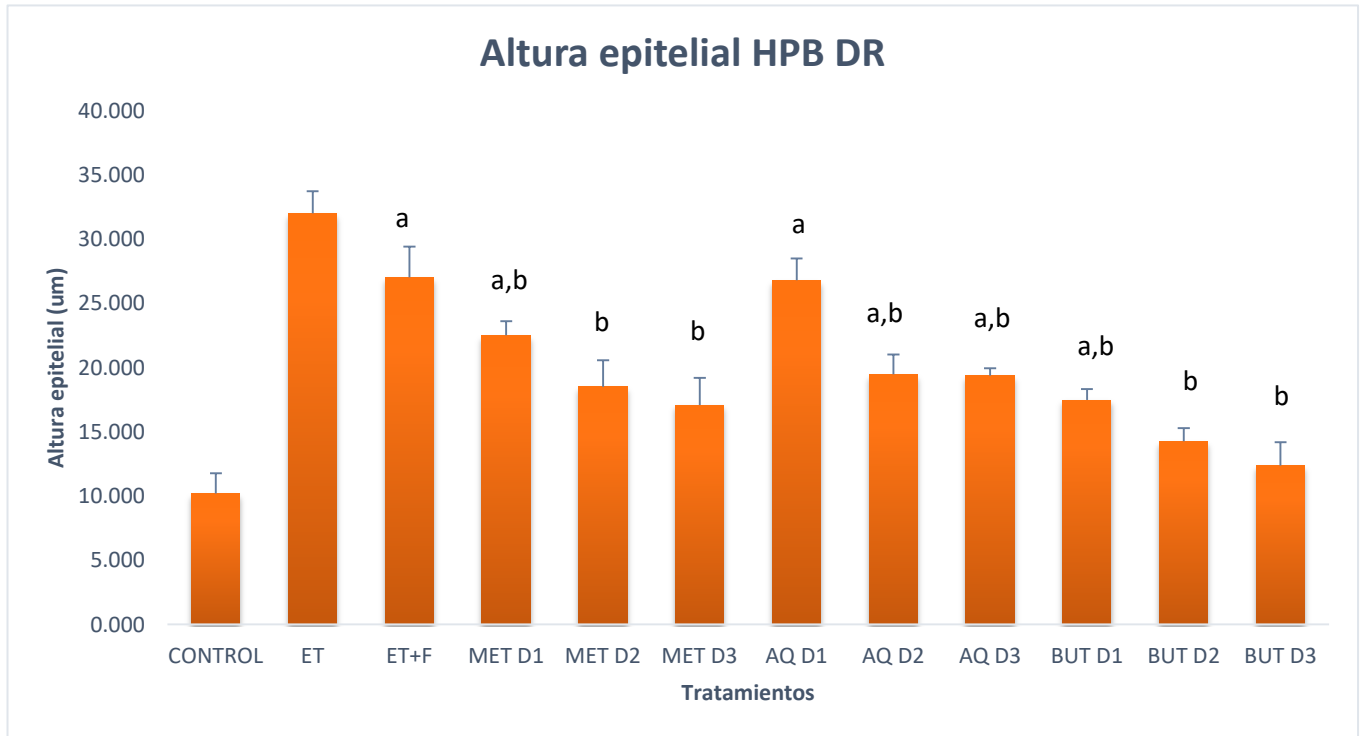
El tratamiento por 21 días con ET produjo un incremento significativo de la altura epitelial prostática, este patrón es revertido con el tratamiento de maca roja. Se logra evidenciar que el mejor efecto en la disminución de la altura epitelial lo presenta el grupo BUT D3 (Tabla 5).

Tabla 5: Valores de la altura epitelial prostática de acuerdo a los grupos de experimentación luego de 21 días de tratamiento. Los valores son media \pm error estándar. ^aP<0.05 respecto al Control, ^bP<0.05 respecto al Grupo ET.

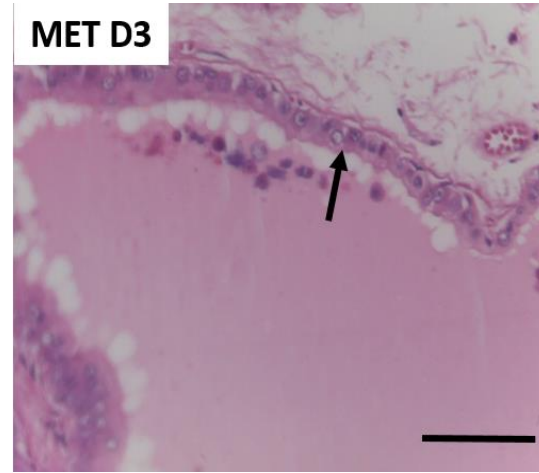
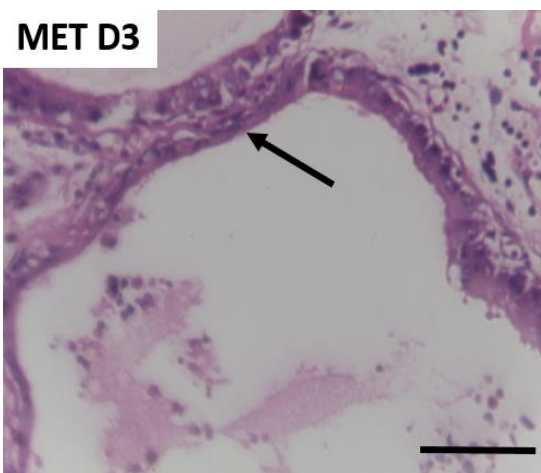
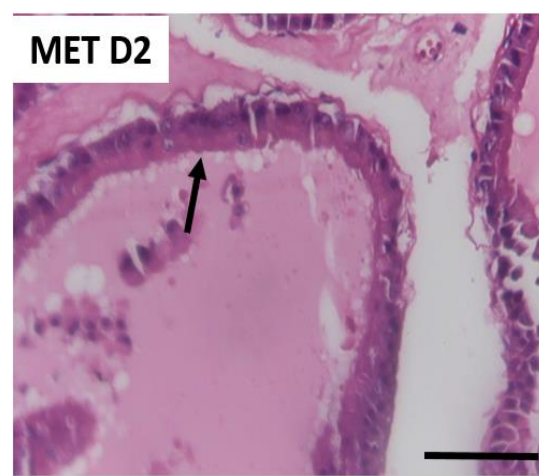
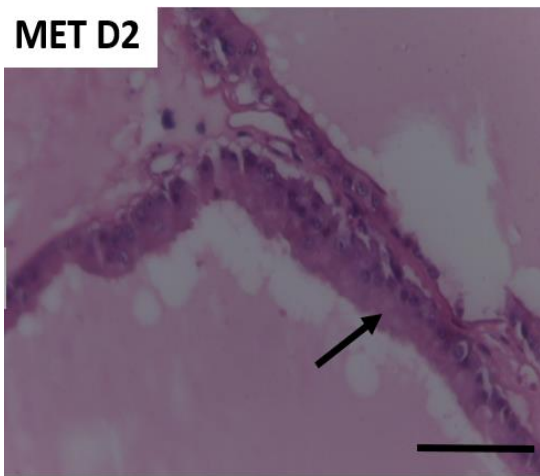
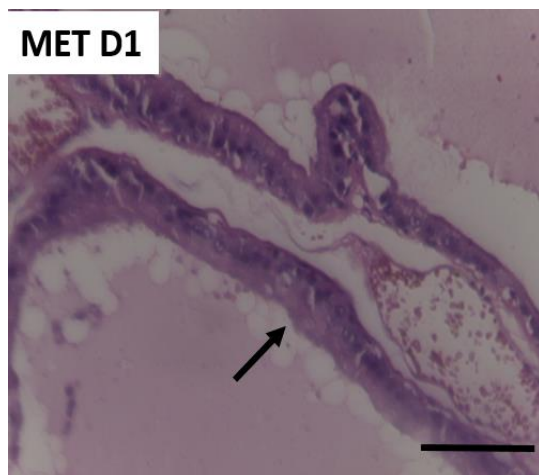
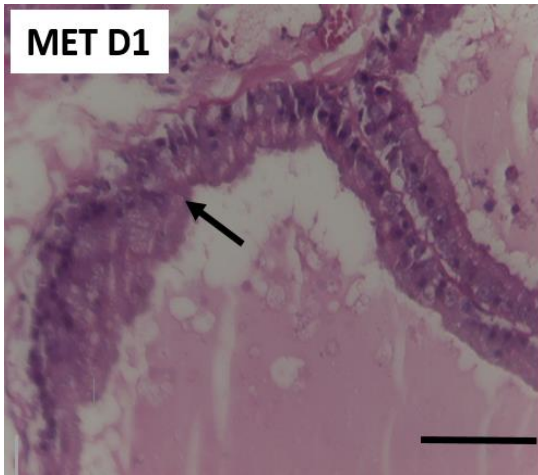
Grupo	Altura epitelial prostática (<i>um</i>)
CONTROL	10.207 \pm 1.553
ET	32.011 \pm 1.721
ET + F	27.024 \pm 2.382 ^a
MET D1	22.504 \pm 1.100 ^{a,b}
MET D2	18.513 \pm 2.059 ^b
MET D3	17.088 \pm 2.099 ^b
AQ D1	26.805 \pm 1.678 ^a
AQ D2	19.465 \pm 1.551 ^{a,b}
AQ D3	19.365 \pm 0.582 ^{a,b}
BUT D1	17.491 \pm 0.839 ^{a,b}
BUT D2	14.262 \pm 1.013 ^b
BUT D3	12.373 \pm 1.808 ^b

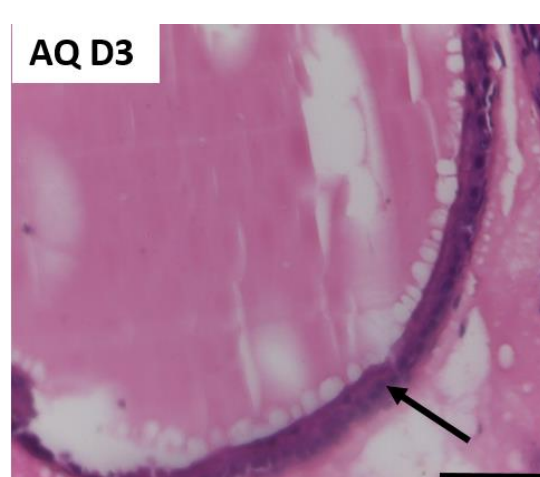
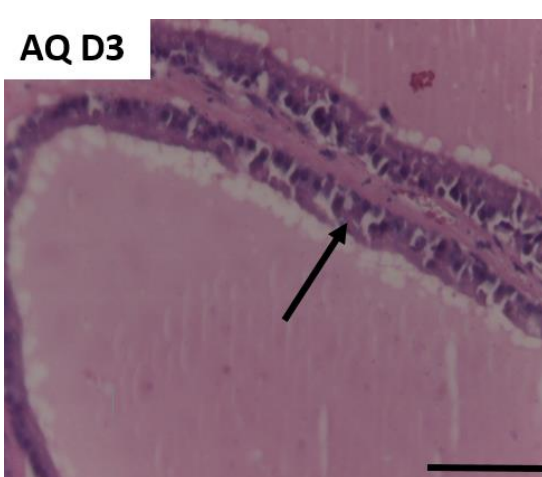
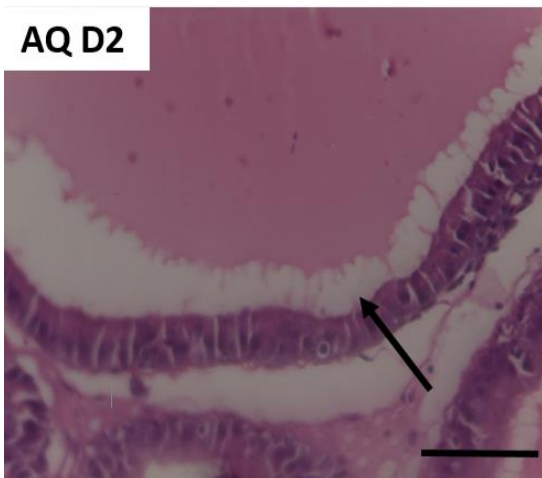
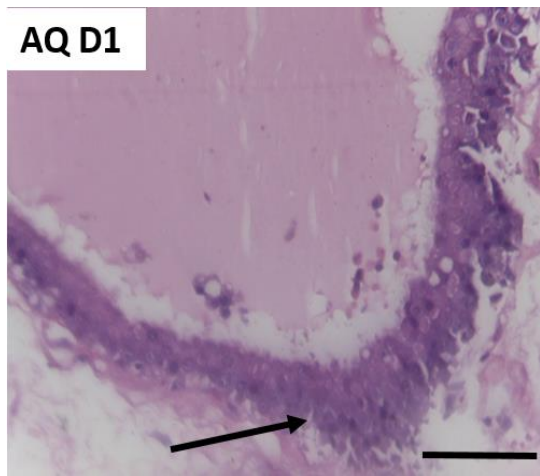
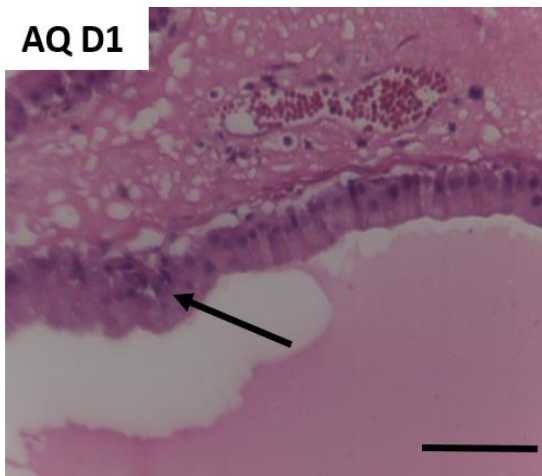
Cada lámina fue dividida en 4 zonas y por cada zona se realizaron 50 mediciones de altura epitelial haciendo un total de 200 mediciones, de esta manera se estaría abarcando toda el área prostática. Las mediciones fueron realizadas a 400X utilizando el microscopio Leica. Los resultados presentados indican que si existe una disminución en la altura epitelial prostática en las dosis metanólico, butanólica y acuoso, además se resalta que a mayor dosis se presenta una menor altura epitelial siendo el grupo butanólico el que presenta el mejor efecto (Gráfico 11)

Grafico 11: Altura epitelial prostática de 69 ratas (12 grupos): Control, Enantato de Testosterona (ET), ET + Finasteride (ET-F), Metanólico Dosis 1 (MET D1), Metanólico Dosis 2 (MET D2), Metanólico Dosis 3 (MET D3), Acuoso Dosis 1 (AQ D1), Acuoso Dosis 2 (AQ D2), Acuoso Dosis 3 (AQ D3), Butanólico Dosis 1 (BUT D1), Butanólico Dosis 2 (BUT D2) y Butanólico Dosis 3 (BUT D3)



Por otro lado, se puede evidenciar microscópicamente el efecto de los diferentes tratamientos para revertir el patrón del incremento de la altura epitelial en la HPB disminuyendo este patrón de diferente manera, evidenciando un mejor efecto en los tratamientos con mayor dosis de maca roja. La flecha señala el epitelio prostático (**Gráfico 12**).





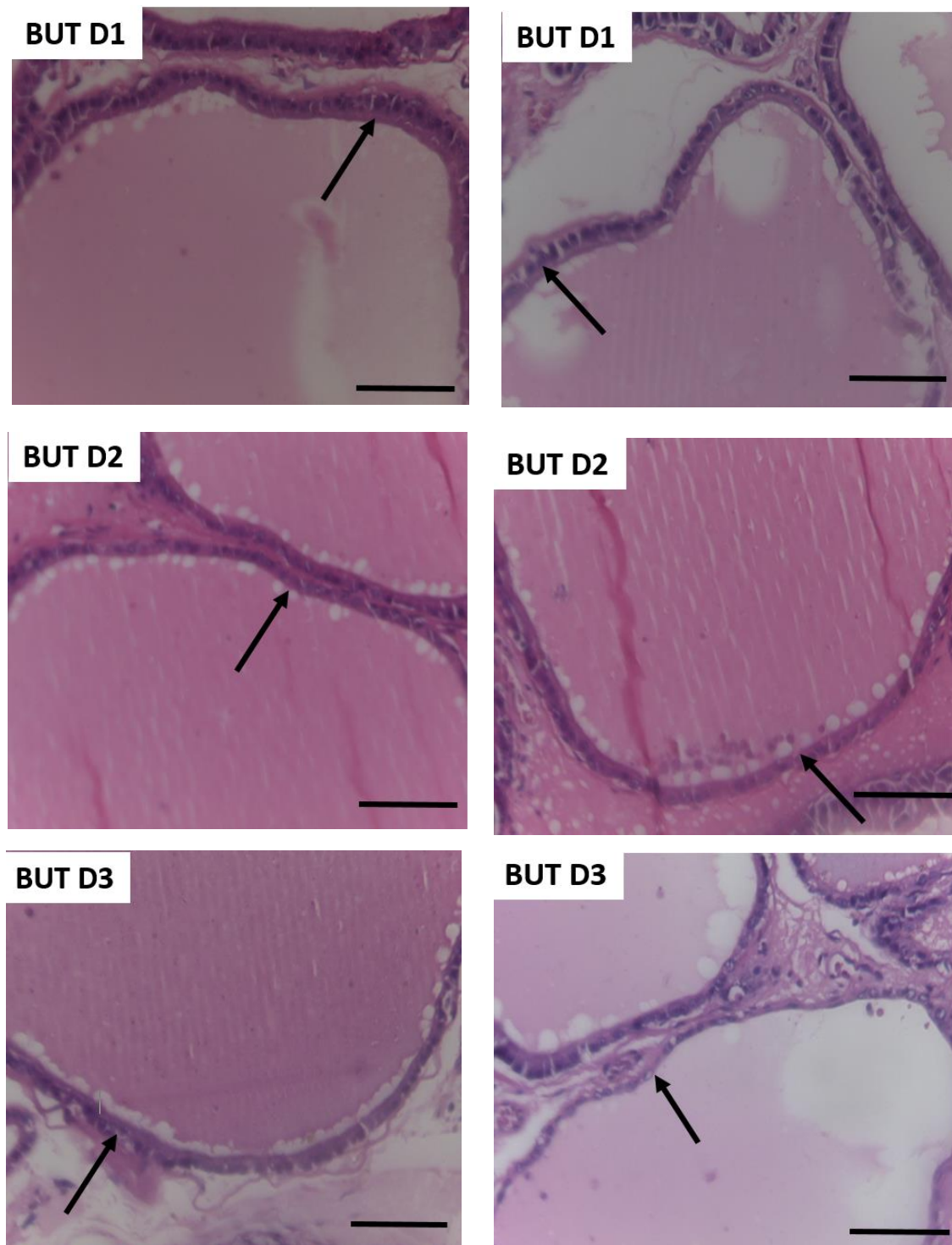


Gráfico 12: Microfotografías de tejido prostático de los 9 grupos (MET D1, MET D2, MET D3, AQ D1, AQ D2, AQ D3, BUT D1, BUT D2 y BUT D3) realizado en el microscopio óptico Leica DM 1000. La escala de la barra negra es de 20 μ m y una magnificación de 400X. Tinción H&E. La flecha indica el epitelio prostático en los diferentes tratamientos y la variación depende del efecto de cada tratamiento. Se hicieron 200 mediciones por lámina.

5.2.4. Área estromal

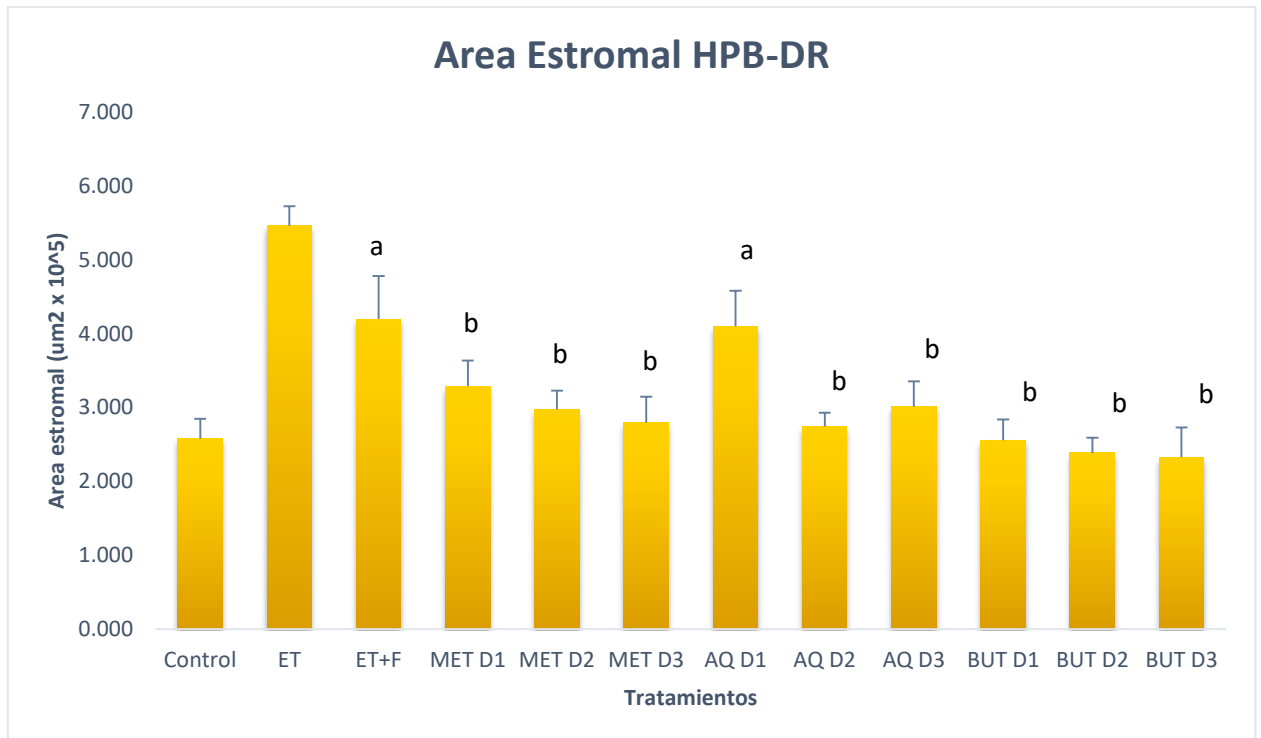
El tratamiento por 21 días con ET produjo un incremento significativo del área estromal prostática, pero se evidencia que con los diferentes tratamientos de Maca Roja a diferentes dosis logran reducir el incremento del are estromal (Tabla 6).

Tabla 6: Valores del área estromal prostática de acuerdo a los grupos de experimentación luego de 21 días de tratamiento. Los valores son media \pm error estándar. aP<0.05 respecto al Control, bP<0.05 respecto al Grupo ET.

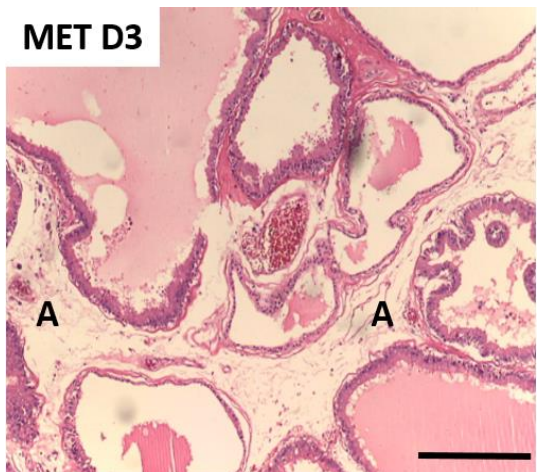
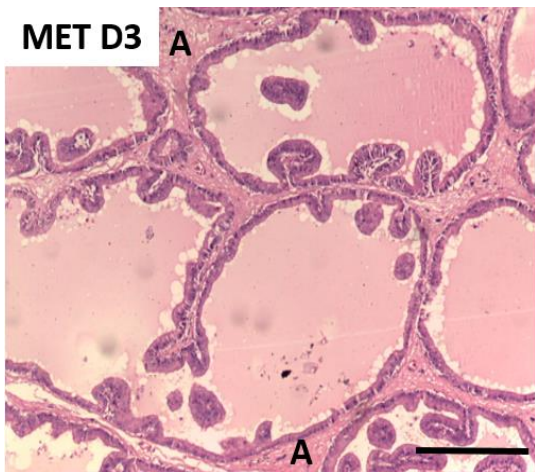
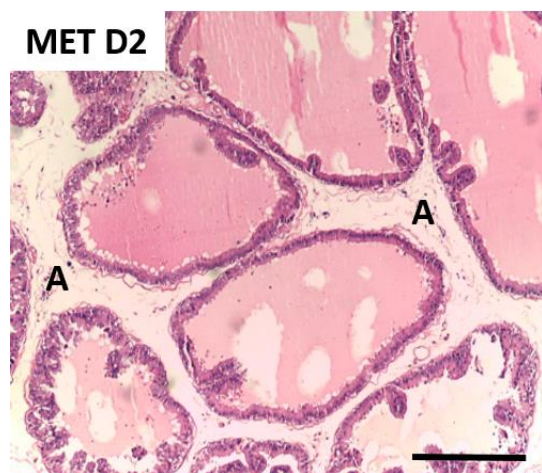
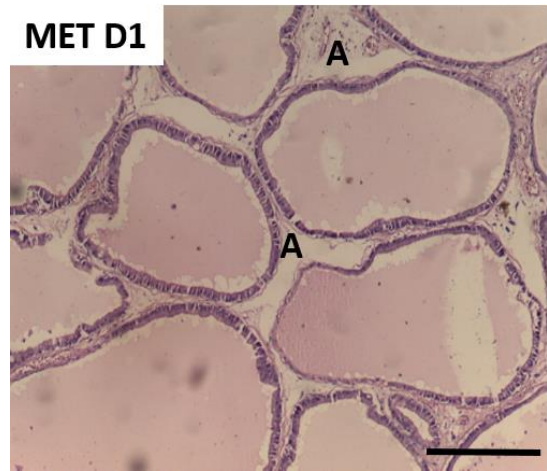
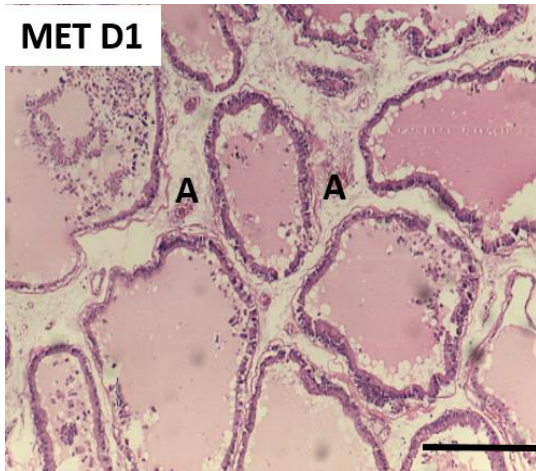
Grupo	Área estromal prostática ($\times 10^5 \mu m^2$)
CONTROL	2.578 \pm 0.271
ET	5.465 \pm 0.260
ET+F	4.199 \pm 0.583 ^a
MET D1	3.289 \pm 0.349 ^b
MET D2	2.973 \pm 0.256 ^b
MET D3	2.795 \pm 0.352 ^b
AQ D1	4.102 \pm 0.481
AQ D2	2.743 \pm 0.188 ^b
AQ D3	3.014 \pm 0.340 ^b
BUT D1	2.556 \pm 0.283 ^b
BUT D2	2.385 \pm 0.208 ^b
BUT D3	2.328 \pm 0.403 ^b

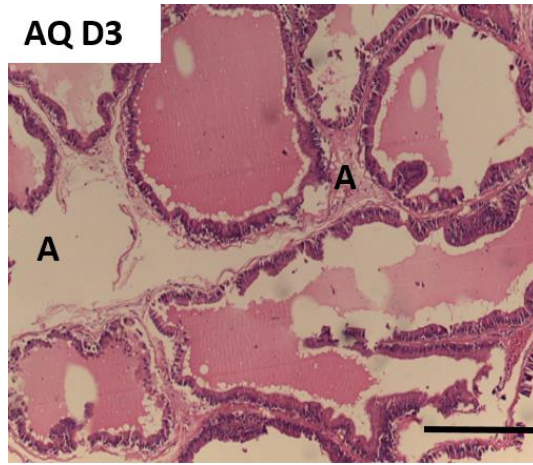
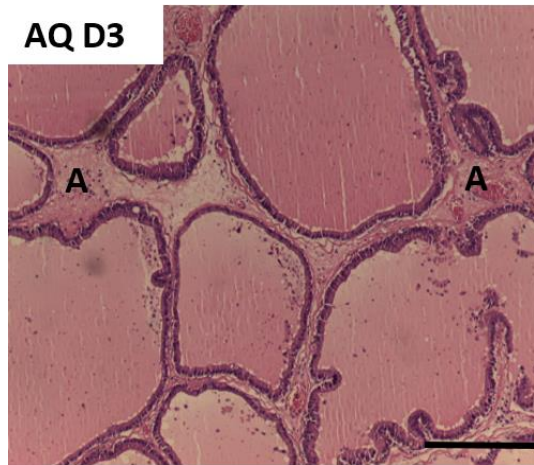
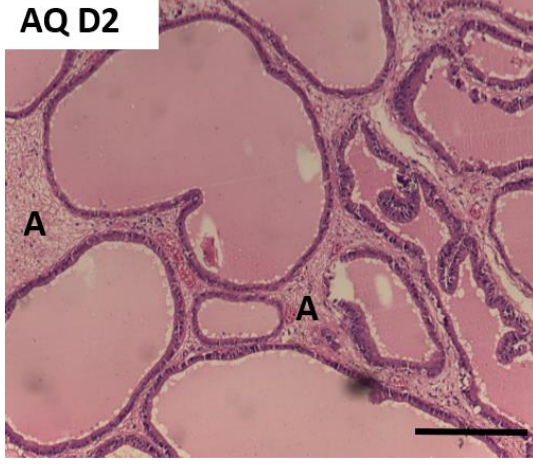
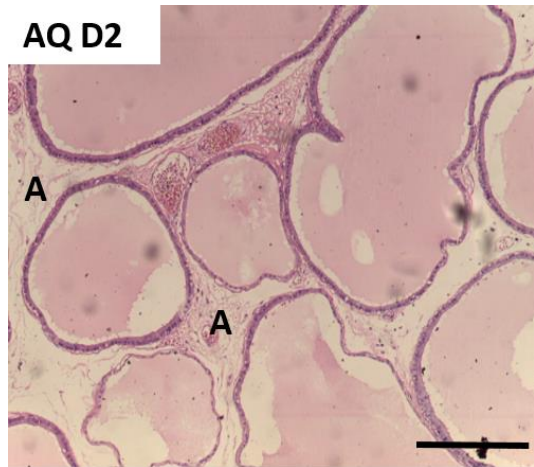
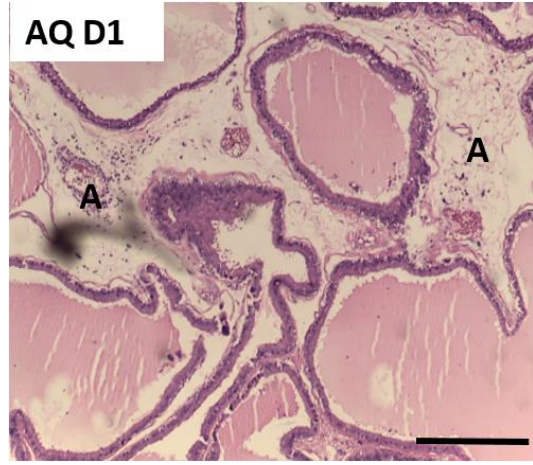
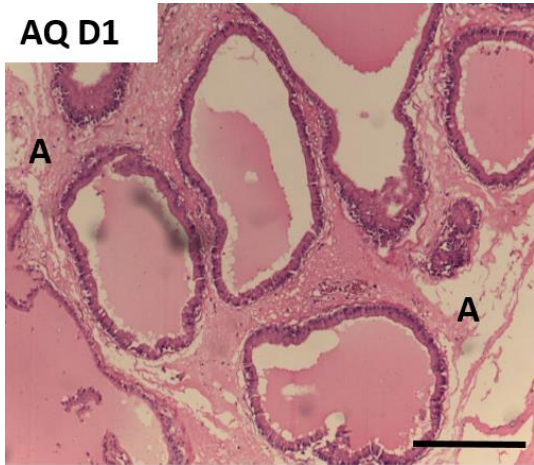
Por cada lamina histológica de tejido prostático se realizaron 4 mediciones, de esta manera se estaría abarcando toda el área prostática. Las mediciones fueron realizadas a 100X utilizando el microscopio Leica. Los resultados presentados indican que los diferentes tratamientos con Maca Roja, a diferentes dosis, presentan efecto en la disminución del área estromal incrementada por el efecto de la administración im del ET (Gráfico 13)

Gráfico 13: Área estromal prostática de 69 ratas (12 grupos): Control, Enantato de Testosterona (ET), ET + Finasteride (ET-F), Metanólico Dosis 1 (MET D1), Metanólico Dosis 2 (MET D2), Metanólico Dosis 3 (MET D3), Acuoso Dosis 1 (AQ D1), Acuoso Dosis 2 (AQ D2), Acuoso Dosis 3 (AQ D3), Butanólico Dosis 1 (BUT D1), Butanólico Dosis 2 (BUT D2) y Butanólico Dosis 3 (BUT D3)



Asimismo, se puede evidenciar microscópicamente el efecto de los diferentes tratamientos para revertir el patrón del incremento del área estromal en la HPB disminuyendo este patrón de diferente manera, evidenciando un mejor efecto en los tratamientos con la fracción butanólica. (Gráfico 14).





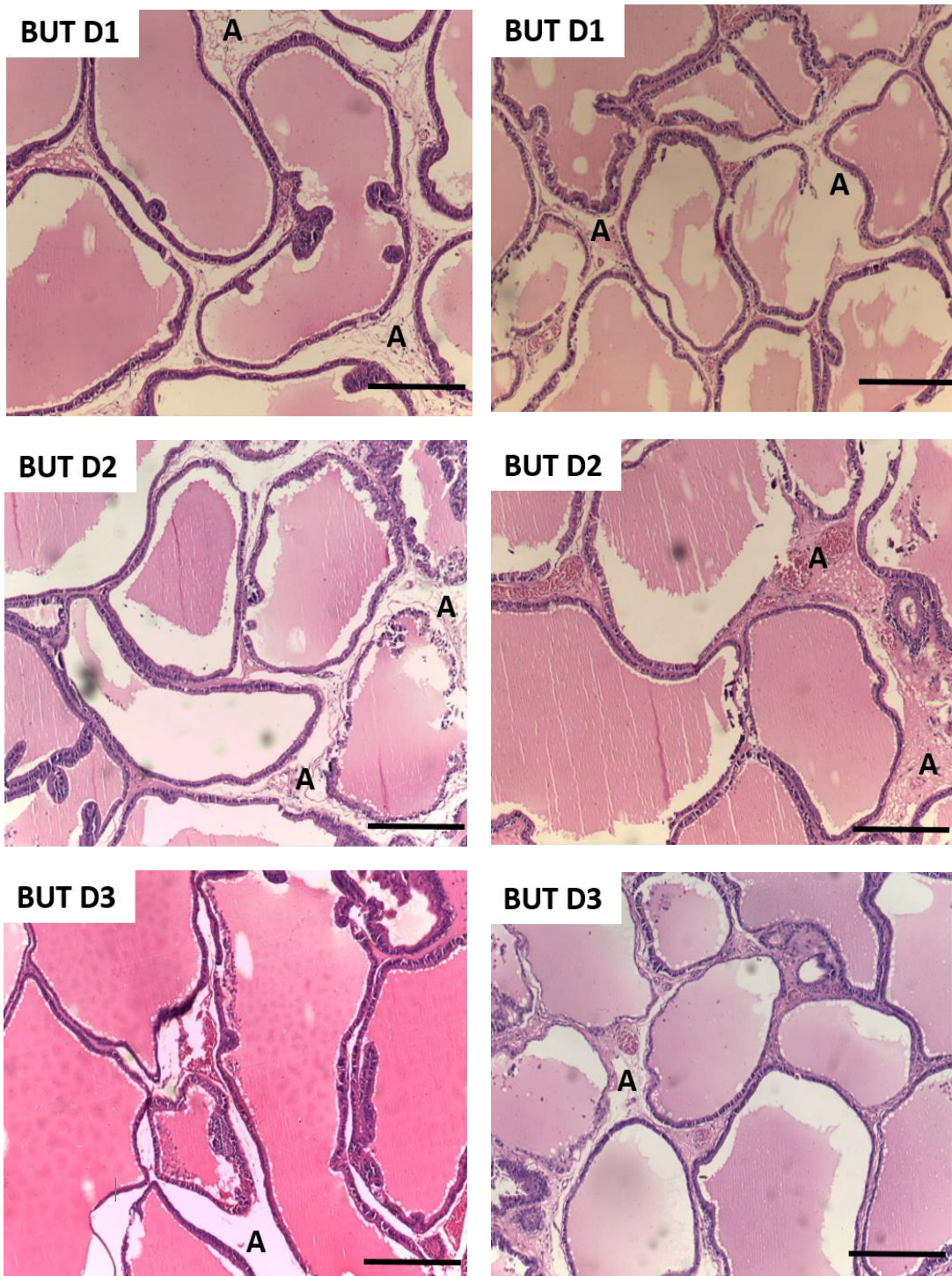


Gráfico 14: Microfotografías de tejido prostático de los 9 grupos (MET D1, MET D2, MET D3, AQ D1, AQ D2, AQ D3, BUT D1, BUT D2 y BUT D3) realizado en el microscopio óptico Leica DM 1000. La escala de barra negra es de 80 μm y una magnificación de 100X. Tinción H&E. La letra A indica el estroma prostático en los diferentes tratamientos y la variación depende del efecto de cada tratamiento. Se hicieron 4 mediciones por lámina.

VI. DISCUSIÓN

La Hiperplasia prostática benigna es una proliferación incontrolada de células del tejido prostático. Varios estudios consideran que es una enfermedad multifactorial, pero solo se ha conocido que el factor hormonal es el que contribuye con el crecimiento hiperplásico de la próstata (Naandesha, 2008).

El desbalance hormonal juega un papel importante en el desarrollo de la Hiperplasia Prostática Benigna. Muy aparte del papel del andrógeno, el estrógeno es una hormona necesaria para mantener una próstata normal. El estrógeno juega un papel importante en la secreción de hormonas sexuales masculinas y en el crecimiento, diferenciación y mantenimiento de la próstata (Griffiths, 2000; Prezioso et al., 2007).

La más importante manifestación patológica de la Hiperplasia Prostática Benigna es el agrandamiento del volumen glandular (en referencia a la vesícula seminal) y el incremento del peso prostático (Di Silverio et al., 2006).

El finasteride, inhibidor de la enzima 5α reductasa 2, enzima que convierte la testosterona en dihidrotestosterona (DHT), andrógeno encargado de la acción proliferativa en la próstata y en las vesículas seminales (Kashiwagi et al; 2005), ha sido indicada como droga para la Hiperplasia Prostática Benigna (Tempany et al, 1993) pero está asociado a diferentes efectos secundarios (Zlotta et al; 2005) por lo que se busca un reemplazo natural de este medicamento.

Además, los diferentes tratamientos de maca roja muestran efectos en bloquear el efecto del enantato de testosterona en la HPB, esto se demuestra con la disminución del peso prostático (Gráfico 2) y confirmado con la disminución de altura epitelial prostática y área estromal a nivel histológico (Gráfico 4,5).

Resultados anteriores respaldan este resultado indicando a la maca roja como candidato en la reducción del efecto de la inducción del enantato de testosterona respecto al peso prostático en ratas con HPB (Gonzales *et al*, 2005). Estudios recientes mencionan el efecto del extracto hidroalcohólico de Maca Roja indicando un mayor efecto en la reducción del peso prostático (Gasco, 2014). Estudios actuales indican que la fracción butanólica reduce el efecto del enantato de testosterona en el modelo de HPB, sin embargo, no hace incidencia en encontrar si las diferentes concentraciones genera algún efecto en la HPB (Vazquez 2017, Fano 2017).

La patogénesis de la HPB no es del todo clara, sin embargo generalmente ocurre en la zona de transición de la próstata y comienzan con alteraciones a nivel del estroma que llegan a estimular el crecimiento y modulan de forma variable la diferenciación de las células epiteliales (Foster, 2000).

En las diferentes gráficas se muestran las distintas fracciones de maca roja y se encontró un mayor efecto en la disminución del peso prostático en la fracción butanólica a diferencia de la fracción acuosa, pero el extracto atomizado de maca roja (MR STD) es el que presenta la mayor reducción de peso prostático en un patrón de HPB (Gráfico 2). Respecto al peso de la vesícula seminal se evidencia que todos los tratamientos con maca roja no logran disminuir el peso de la vesícula seminal a diferencia del finasteride, siendo esto un resultado esperado para evitar efectos secundarios (Gráfico 3)

En la patología de la HPB se evidencia un incremento del epitelio y el estroma (Wang y Olumi, 2011), es por ello que se realizaron medidas de altura epitelial y área estromal como patrones para evidenciar el efecto que tienen los diferentes tratamientos sobre la HPB. Respecto a la altura epitelial, se evidencia un aumento en casi el triple de la altura epitelial del grupo ET respecto al control (Tabla 3), este resultado es semejante al obtenido por Falleiros et al (2016) en donde el epitelio aumenta en casi el doble en el grupo con ET respecto al control. Se evidencia menor incremento de la altura epitelial con el Finasteride, pero esta diferencia no es significativa respecto a los tratamientos con maca roja (Gráfico 4). Entre los tratamientos con maca roja se evidencia el mayor efecto en la reducción de altura epitelial con respecto al tratamiento con la fracción butanólica de maca roja a diferencia del tratamiento con fracción acuosa que presenta una menor reducción de altura epitelial respecto a los 4 grupos de tratamiento de maca roja (Tabla 3, Gráfico 4), pero ambos resultados son significativamente diferentes respecto al grupo ET.

El tratamiento con la fracción butanólica de MR muestra un mayor efecto en cuanto al incremento de la altura del epitelio en la hiperplasia prostática benigna siendo el incremento menor en esta fracción con respecto a las otras fracciones obtenidas de MR. Se logra evidenciar una disminución del área estromal con la administración de finasteride pero este resultado no es significativamente diferente respecto al grupo ET, sin embargo se demuestra una disminución del área estromal de los 4 grupos con tratamiento de maca roja que resultan ser significativamente diferentes respecto al grupo ET (Gráfico 6). A nivel histológico se demuestra lo mencionado, en donde el estroma se encuentra incrementado en el grupo ET y va reduciéndose con los diferentes tratamientos debido a la mayor presencia de acinos prostáticos que ocupan este espacio, siendo más evidente esta reducción en los tratamientos con maca roja (Gráfico 7)

Estos resultados nos indican que la maca roja es un candidato para revertir el patrón de HPB al lograr evitar el incremento del área estromal ocasionado por la administración de ET. La HPB logra aumentar el estroma de una manera considerable y se evidencia una mayor reducción estromal en los tratamientos con maca roja y dentro de estos el que presenta una mayor reducción es el grupo con la fracción butanólica.

Luego de demostrar que las fracciones de maca roja muestran un efecto positivo sobre la hiperplasia prostática benigna, el segundo experimento realizado se basó en averiguar si realmente la concentración de la dosis utilizada es un factor importante en la disminución del patrón de hiperplasia prostática benigna.

Respecto a los resultados de pesos corporales en el experimento de dosis respuesta, se puede evidenciar un ligero aumento de peso corporal después de la segunda administración de ET para casi todos los tratamientos (excepto para el grupo AQ D2), pero esta diferencia no es significativa (Gráfico 8)

Respecto al peso prostático se muestran resultados diferentes a lo esperado. El peso prostático de la dosis 1 resulta menor que la dosis 2 y luego se reduce este peso en la 3era dosis, este patrón es similar para todos los tratamientos indicándonos hasta ese momento que no hay relación entre la concentración de la dosis respecto al patrón de hiperplasia al no encontrarse una tendencia única al aumentar la concentración de la dosis. (Gráfica 9)

Lo contrario sucede con el peso vesicular, se logra evidenciar que mientras mayor sea la dosis, el peso de la vesícula seminal tiende a incrementar (excepto del grupo acuoso, a mayor dosis el peso vesicular disminuye). (Gráfico 10)

Se indicó anteriormente que la altura epitelial y el área estromal son indicadores de la hiperplasia prostática benigna. Respecto al primer indicador, se evidencia que existe una diferencia notable para ambos tratamientos al disminuir la altura epitelial conforme se va aumentando la dosis del tratamiento (Tabla 5). Sin embargo, se evidencia que entre la altura epitelial de AQ D1 y AQ D2 hay una gran disminución respecto a los otros tratamientos. Además, se observa que la altura epitelial del grupo BUT D1 se asemeja a la altura epitelial del grupo MET D3, además la altura epitelial en el grupo butanólico es la que logra disminuir en mayor proporción respecto a los otros tratamientos (Gráfico 11). Esta disminución se logra evidenciar en las respectivas imágenes de los cortes histológicos donde el tratamiento con las diferentes dosis del grupo butanólico evidencia histológicamente una menor altura epitelial (Gráfico 12). Este resultado nos indica el mejor efecto de la fracción butanólica en la reducción la altura epitelial a diferentes dosis (siendo el mejor efecto la dosis 3) respecto a los otros tratamientos alternativos de maca roja

El último indicador a analizar es el área estromal. Se logra evidenciar que en casi todos los tratamientos se ve una disminución del área estromal a diferentes dosis (Tabla 6), excepto en el grupo AQ D2 y AQ D3 en donde el área estromal aumenta. Asimismo, se observa que el área estromal del grupo BUT D1 resulta ser menor que el área estromal del grupo MET D3 logrando disminuir el área estromal conforme se va aumentando la dosis (Gráfico 13). Esta disminución se logra evidenciar en las imágenes de los cortes histológicos

realizados en donde se evidencia la mayor disminución del área estromal de las diferentes concentraciones del grupo butanólico (Gráfico 14).

Sin embargo, no se logra evidenciar una relación directa entre la disminución del peso prostático, la altura epitelial y el área estromal en todos los grupos tratados con MR, esto puede deberse a una mala administración de la muestra o por error humano al momento de calcular el peso prostático. No se observan diferencias en los resultados experimentales en los 3 grupos tratados (extracto metanólico, fracciones acuosa y butanólica), todos presentan un patrón similar, esto puede ser ocasionado por un mal cálculo en la preparación de los extractos y la falta de control de calidad.

Pero en términos generales este problema se debe al no haber verificado que el proceso de fraccionamiento del extracto metanólico sea adecuadamente ejecutado generando posiblemente que las fracciones no estén purificadas totalmente, es decir, que la fracción butanólica y acuosa presenten ambos componentes en su composición, para ello se debió realizar una cromatografía de capa fina asegurando así la pureza del extracto.

Finalmente podemos concluir con el efecto benéfico de los tratamientos con la fracción butanólica y acuoso de maca roja, evidenciando un mayor efecto antiproliferativo de la fracción butanólica.

VII. CONCLUSIÓN

1. La fracción butanólica del extracto metanólico de hipocótilos de maca roja permite conservar significativamente la altura epitelial y el área estromal respecto a los tratamientos con fracción acuosa y extracto metanólico en el modelo de HPB inducida por enantato de testosterona en ratas de la cepa Holtzman
2. No se evidencia efecto en los diferentes tipos de dosis respecto a la disminución del peso prostático, a diferencia de la altura epitelial y el área estromal.
3. Las diferentes concentraciones de la fracción butanólica logran disminuir considerablemente la altura epitelial y el área estromal especialmente en la mayor dosis (473 mg/kg) de la fracción butanólica (BUT D3)

VIII. SUGERENCIAS

1. Encontrar mediante estudios cromatograficos que componente de la fracción butanólica es la que está realizando el efecto sobre la HPB y realizar estudios dosis respuesta estandarizando los controles.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Amălinei C. 2006. Reciprocal epithelio-stromal interactions in normal and neoplastic prostate. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. Apr-Jun;110(2):391-8.
2. Berteaux N, Lottin S, Adriaenssens E, Van Coppenolle F, Leroy X, Coll J, Dugimont T, Cury JJ. 2004. Hormonal regulation of H19 gene expression in prostate epithelial cells. J Endocrinol. 2004 Oct;183(1):69-78. Erratum in: J Endocrinol. Dec;183(3)
3. Chung F, Rubio J, Gonzales C, Gasco M, Gonzales G. 2005. Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. Journal of Ethnopharmacology 98 (2005) 143–147.
4. Cunha G, Wang Y, Hayward S, Risbridger G. 2001. Estrogenic effects on prostatic differentiation and carcinogenesis. Reprod Fertil Dev. 13(4): 285-96.
5. Di Silverio, F., Bosman, C., Salvatori, M., Albanesi, L., Proietti Pannunzi, L., Ciccariello, M., Cardi, A., Salvatori, G., Sciarra, A., 2006. Combination therapy with rofecoxib and finasteride in the treatment of men with lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH). J. Urol. 175, 633–634.
6. Falleiros L, Perez A, Taboga S, Dos Santos F, Vilamaior P. 2016. Neonatal exposure to ethinylestradiol increases ventral prostate growth and promotes epithelial hyperplasia and inflammation in adult male gerbils. Int. J. Exp. Path. (2016), 97, 380–388.
7. Fano, D. 2017. Efecto del extracto metanólico de Maca Roja (*Lepidium meyenii*) y sus fracciones butanólica y acuosa sobre la expresión genética de los receptores de andrógenos, receptor α de estrógeno y receptor β de estrógeno en próstata de rata de la cepa Holtzman inducido a Hiperplasia Prostatica Benigna con enantato de testosterona. Tesis para optar grado de licenciatura. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
8. Foster, C.S., 2000. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Prostate 45, 4–14.
9. Gao, W., Kerabey, J.D., Nair, V.A., Chung, K., Parlow, A.F., Miller, D.D., Dalton, J.T., 2004. Comparison of the pharmacological effects of a novel selective androgen receptor modulator, the 5 alpha-reductase inhibitor Finasteride, and the antiandrogen hydroxyflutamide in intact rats: new approach for benign prostate hyperplasia. Endocrinology 145, 5420–5428.
10. Gasco M, Aguilar J, Gonzales GF. 2007. Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on

- reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. *Andrologia*. 39(4):151-8.
11. Gasco M, Villegas L, Yucra S, Rubio J, Gonzales GF. 2007. Effect dose-response of red maca on benign prostate hyperplasia in male rats. *Phytomedicine* 14:460–464.
 12. Gasco M. 2014. Efecto diferencial de *Lepidium meyenii* (Maca Roja) y finasteride sobre los procesos inflamatorios en la Hiperplasia Prostatica Benigna inducida con enantato de testosterona en ratas de la cepa Holtzman. Tesis para optar grado de doctorado. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
 13. Gonzales, G.F., Cordova, A., Gonzales, C., Chung, A., Vega, K., Villena, A., 2001. Improved sperm count after administration of *Lepidium meyenii* (Maca) in adult men. *Asian Journal of Andrology* 3, 301–304.
 14. Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, Fernandez G, Yucra S, Rubio J, et al. 2005. Red Maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reprod Biol Endocrinol*;3(1):5.
 15. Gonzales C. 2007. Efecto dosis respuesta del extracto hidroalcohólico de maca roja (*Lepidium meyenii*) sobre la próstata en ratas tratadas con andrógenos y estrógenos exógenos. Msc thesis, Faculty of Science and Phylosophy, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Peru.
 16. Gonzales-Castañeda C, Gonzales GF. 2008. Hypocotyls of *Lepidium meyenii* (maca), a plant of the Peruvian highlands, prevent ultraviolet A-, B-, and C-induced skin damage in rats. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*; 24(1):24-31.
 17. Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, Fernandez G, Yucra S, Rubio J, Yi P, Gasco M. 2005. Red Maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 3:5.
 18. Greenberg NM, DeMayo F, Finegold MJ, Medina D, Tilley WD, Aspinall JO, Cunha GR, Donjacour AA, Matusik RJ, Rosen JM. 1995. Prostate cancer in a transgenic mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:3439-3443.
 19. Griffiths, K., 2000. Estrogens and prostatic disease. *Prostate* 45, 87–100.
 20. Gunduz E, Dursun R, Zengin Y, Icer M, Durgun H, Kaplan I, Alabalik U, Gurbuz H. 2015. *Lycium barbarum* extract provides effective protection against paracetamol induced acute hepatotoxicity in rats. *Int J Clin Exp Med* 8(5): 7898-7905
 21. Hellstrom W. 2006. Current and future pharmacotherapies of premature ejaculation. *J Sex Med*. 3(4): 332-41.
 22. Jesik CJ, Holland JM, Lee C. 1982. An anatomic and histologic study of the rat prostate. *Prostate*, 3:81-97.

23. Kapoor A. 2012. Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) management in the primary care setting. *Can J Urol.* 19 (Suppl 1): 10-17.
24. Kashiwagi, B., Shibata, Y., Ono, Y., Suzuki, R., Honma, S., Suzuki, K., 2005. Changes in testosterone and dihydrotestosterone levels in male rat accessory sex organs, serum, and seminal fluid after castration: establishment of a new highly sensitive simultaneous androgen measurement method. *J. Androl.* 26, 586–591.
25. Mc Neal JE. 1981. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 2 :35-49.
26. Nandeesh H. 2008. Hiperplasia prostática benigna: los factores de riesgos dietéticos y metabólicos. *Int Urol Nephrol* 40 (3): 649-56.
27. Prakash K, Pirozzi G, Elashoff M, Munger W, Waga I, Dhir R, Kakehi Y, Getzenberg RH. 2002. Symptomatic and asymptomatic benign prostatic hyperplasia: molecular differentiation by using microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 28;99(11):7598-603.
28. Prezioso, D., Denis, L.J., Klocker, H., Sciarra, A., Reis, M., Naber, K., Lobel, B., Pacik, D., Griffiths, K., 2007. Estrogens and aspects of prostate disease. *Int. J. Urol.* 14, 1–16.
29. Reznicek SB. 2000. Common urologic problems in the elderly. Prostate cancer, outlet obstruction and incontinence require special management. *Postgraduate Medicine.* 107:163–68.
30. Robert G, Descazeaud A, Nicolaiew N, Terry S, Sirab N, Vacherot F, Maille P, Allory Y, De La Taille A. 2010. Inflammation in benign prostatic hyperplasia: a 282 patients immunohistochemical analysis. *Prostate* 69(16): 1774-1780.
31. Rubio J, Yucra S, Gasco M, Gonzales G. 2011. Dose–response effect of black maca (*Lepidium meyenii*) in mice with memory impairment induced by ethanol. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2011; 21(8): 628–634.
32. Siler U, Herzog A, Spitzer V, Seifert N, Denelavas A, Hunziker PB, Barella L, Hunziker W, Lein M, Goralczyk R, Wertz K. 2005. Lycopene effects on rat normal prostate and prostate tumor tissue. *J Nutr.* Aug;135(8):2050S-2S.
33. Sugimura Y, Cunha GR, Donjacour AA. 1984. Morphogenesis of ductal networks in the mouse prostate. *Biol Reprod* 1986;34:963; and [left] McNeal JE. Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog Clin Biol Res* 1984;145:27–53.
34. Talpur, N., Echard, B., Bagchi, D., Bagchi, M., Preuss, H.G., 2003. Comparison of Saw Palmetto (extract and whole berry) and Cernitin on prostate growth in rats. *Mol. Cell Biochem.* 250, 21–26.

35. Tello J, Hermann M, Calderon A. 1992. La Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) cultivo alimenticio potencial para las zonas altoandinas. Boletín de Lima 14:59–66
36. Tempany, C.M., Parting, A.W., Zerhouni, E.A., Zinreich, S.J., Walsh, P.C., 1993. The influence of Finasteride on the volume of the peripheral and periurethral zones of the prostate in men with benign prostatic hyperplasia. Prostate 22, 39–42.
37. Vasquez, C. 2017. Acción diferencial del extracto metanólico y sus fracciones butanólica y acuosa de maca roja (*Lepidium meyenii*) en Hiperplasia Prostática Benigna en ratas inducidas con enantato de testosterona: efecto sobre la expresión de receptores de andrógenos. Tesis para optar grado de licenciatura. Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
38. Wakabayashi K, Ochiai M, Saitô H, Tsuda M, Suwa Y, Nagao M, Sugimura T. Presencia de ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro-beta-carbolin-3-carboxílico, un precursor de un compuesto nitroso mutagénico, en salsa de soja. Proc Natl Acad Sci US A; 80 (10): 2912-6.
39. Wang Z, Olumi AF. 2011. Diabetes, growth hormone-insulin-like growth factor pathways and association to benign prostatic hyperplasia. Differentiation 82: 261–271.
40. Zaichick V, Sviridova TV, Zaichick SV. 1997. Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. Int Urol Nephrol. 29:565–74.
41. Zeliadt, S.B., Etzioni, R.D., Penson, D.F., Thompson, I.M., Ramsey, S.D., 2005. Lifetime implications and cost-effectiveness of using Finasteride to prevent prostate cancer. Am. J. Med. 118, 850–857.
42. Zlotta, A.R., Teillac, P., Raynaud, J.P., Schulman, C.C., 2005. Evaluation of male sexual function in patients with Lower Urinary Tract Symptoms (LUTS) associated with benign prostatic hyperplasia (BPH) treated with a phytotherapeutic agent (Permixon), Tamsulosin or Finasteride. Eur. Urol. 48, 269–276.