

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA ALBERTO
CAZORLA TALLERI



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**“Efecto modulador de la maca (*Lepidium meyenii*)
sobre el sistema endocannabinoide: estudios en
humanos y en animales.”**

Dulce Esperanza Alarcón Yaquetto

Tesis para optar el Título de Licenciado en Ciencias con mención en
Biología

Asesor: Dr. Gustavo F. Gonzales Rengifo

Lima – Perú

2016

Miembros del Jurado

Dr. Francisco Peirano Blondet Presidente

Dr. José Aliaga Arauco Vocal

MSc. Luis Rossi Mayo Secretario

Dedicatoria

*A las mayores Glorias de mi vida:
Gloria Esperanza y Gloria José.*

Agradecimiento

Sirvan estas líneas para agradecer a todo el grupo de investigadores que participó en la toma de muestras del proyecto “Metabolómica de la maca en altura y a nivel del mar” conducidos por el Dr. Gustavo F. Gonzales en Lima y la Mag. Lidia Sofía Caballero Gutiérrez en Puno. Su invaluable colaboración demuestra que el hacer ciencia en el Perú es una pasión compartida por profesionales de diversas especialidades e instituciones.

Mi especial agradecimiento a los doctores Ikhlas Khan y Jianping Zhao de la Universidad de Mississippi quienes proporcionaron la cuantificación de los metabolitos presentes en los hipocótilos deshidratados de maca amarilla, roja y negra.

Resumen

Hace más de un cuarto de siglo se identificó un receptor acoplado a proteína G al que se unía el compuesto Δ^9 tetrahidrocannabinol: el receptor CB1. Desde entonces se ha identificado un sistema de señalización pleiotrópico que incide en diversos sistemas fisiológicos entre ellos el inmune, el nervioso y el reproductivo a través de ligandos endógenos derivados de los ácidos grasos y fue bautizado como sistema endocannabinoide (eCB). Un impulso nervioso desencadena la síntesis de los endocannabinoides y una vez cumplida su función son degradados por una enzima clave: hidrolasa de ácidos grasos amídicos (FAAH). Este sistema es modificado por sustancias exógenas entre ellas, la maca, un hipocótilo peruano con propiedades terapéuticas que tiene la capacidad de inhibir FAAH y mejorar el “tono endocannabinoide”. Este trabajo ha sido diseñado para evaluar varios endocannabinoides en suero de varones y mujeres adultas de Lima (150 m) y Puno (3800 m) antes y después de consumir durante doce semanas de manera diaria un extracto atomizado de maca roja o negra. Igualmente se ha realizado un estudio experimental en ratones macho adultos para comprobar si los efectos de maca negra sobre fatiga y conteo espermático persisten después de bloqueado el receptor CB1 con un fármaco antagonista selectivo: AM251.

Los niveles de endocannabinoides en los pobladores de Puno fue mayor que en los de Lima, y se encontró una relación lineal de endocannabinoides con concentraciones elevadas de hemoglobina, y menor saturación parcial de oxígeno; evidenciando un posible rol en los mecanismos de adaptación a la altura. Tras el consumo de maca, los niveles de endocannabinoides disminuyen en los pobladores de Puno.

En el estudio en animales, el bloqueo del receptor CB1 inhibió los efectos de maca en el conteo espermático y en el retardo en fatiga, demostrando que este receptor es necesario para que la maca pueda ejercer su función.

PALABRAS CLAVE: ENDOCANNABINOIDE, RECEPTOR CB1, LEPIDIUM MEYENII, AM251.

Abstract

More than 25 years ago, a G-protein coupled receptor was identified. This receptor is the target of Δ^9 tetrahydrocannabinol, the compound behind the psychotropic effects of *Cannabis sativa* and since was named cannabinoid receptor 1 (CB1). Ever since a novel signaling system was described with pleiotropic effects on different physiological systems including the immune, reproductive and nervous ones through a wide array of endogenous ligands derived from fatty acids called endocannabinoids. The particular metabolism of this system and its delicate regulation prompted an enormous wave of investigations towards it. An impulse fires the synthesis of the endocannabinoids and once they exert their function, a key enzyme quickly degrades them: the fatty acidic amid hydrolase (FAAH). This system is significantly modified by exogenous substances including *Lepidium meyenii*, a Peruvian root with medicinal properties on systems that have a high density of cannabinoid receptors. Its mechanism of action could be the ability to inhibit FAAH and enhancing the “endocannabinoid tone”.

This work has been designed to evaluate several serum endocannabinoid levels in adult men and women from Lima (150 m) and Puno (3800 m) before and after a 12- week daily treatment with atomized dried red or black maca compared to a placebo. Equally, an experimental study was conducted in adult male mice to test whether the effects of black maca on sperm parameters and fatigue persisted after the pharmacological blockade of CB1 with AM251, a selective antagonist. A possible mechanism of action of *Lepidium meyenii* is discussed.

KEYWORDS: ENDOCANNABINOID, CB1 RECEPTOR, LEPIDIUM MEYENII, AM251

Índice general

1. Capítulo I: Introducción	1
1.1. Propósito del estudio	3
1.2. Antecedentes existentes	3
1.2.1. El sistema endocannabinoide	3
1.2.1.1. Receptores acoplados a proteína G	5
1.2.1.2. Maquinaria enzimática y síntesis de endocannabinoides.....	6
1.2.1.3. Hidrolasa de ácidos grasos amídicos	6
1.2.1.4. El rol de la anandamida y el receptor CB1 en los sistemas fisiológicos.....	7
1.2.1.5. Otros endocannabinoides de importancia.	8
1.2.2. La vida en las alturas	9
1.2.2.1. Mal de montaña crónico.....	9
1.2.2.2 Funcionamiento del Sistema Endocannabinoide en condiciones de hipoxia	10
1.2.3. <i>Lepidium meyenii</i> y su rol en el sistema endocannabinoide.....	11
1.3. Situación actual de la investigación	14
1.4. Hipótesis.....	15
1.4.1. Humanos.....	15
1.4.2. Animales.....	15
1.5. Objetivos	15
1.5.1. General	15
1.5.2. Específico	15
1.5.2.1. Humanos	15
1.5.2.2. Animales	15
2. Capítulo II. Materiales y métodos	16
2.1. Estudios en humanos.....	16
2.1.1. Criterios de inclusión y exclusión	16
2.1.2. Consentimiento informado	16
2.1.3. Variables analizadas	18
2.1.4. Tratamiento y duración.....	18
2.1.5. Análisis estadístico	19

2.2. Estudio en animales.....	20
2.2.1. Diseño.....	20
2.2.2. Animales de experimentación	20
2.2.3. Aclimatación.....	20
2.2.4. Ética.....	20
2.2.5. Tratamientos y Dosificación.....	20
2.2.6. Preparación del extracto acuoso de maca.....	21
2.2.7. Preparación del AM251	21
2.2.8. Grupos según tratamiento.....	21
2.2.9. Evaluación de parámetros espermáticos.....	23
2.2.10. Prueba de nado forzado	23
2.2.11. Análisis estadístico	23
3. Capítulo III: Resultados.....	24
3.1. Estudios en humanos.....	24
3.1.1. Relación de los endocannabinoides y ácidos grasos en plasma de hombres y mujeres de Lima y Puno medidos por metabolómica	24
3.1.2. Relación de endocannabinoides con variables biológicas.....	24
3.1.3. Patrones basales de endocannabinoides y metabolitos asociados a nivel del mar y en la altura	29
3.1.4. Endocannabinoides y metabolitos relacionados a la inflamación	29
3.1.5. Efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles de eCBs.....	31
3.2. Estudios en animales.....	33
3.2.1. Pesos corporales y de órganos reproductivos.....	33
3.2.2. Bloqueo de CB1 sobre la respuesta biológica a la maca negra	35
3.2.2.1. AM251 inhibe efectos positivos de la maca sobre parámetros espermáticos	35
3.2.2.2. El efecto en el retardo en el tiempo de fatiga de la maca negra depende del receptor CB1	37
3.3. Discusión.....	38
3.3.1. Estudios en humanos	38
3.3.1.1. Rol de los endocannabinoides en la fisiopatología del mal de montaña crónico.....	38
3.3.1.2. Presión arterial y endocannabinoides.....	42

3.3.1.3. Endocannabinoides e inflamación	42
3.3.2. Estudios en animales	43
3.3.2.1. AM251 no tiene efectos en el peso de animales estudiados	43
3.3.2.2. Bloqueo farmacológico de CB1 inhibe efectos de maca sobre parámetros espermáticos.....	43
3.3.2.3. El efecto energizante de <i>Lepidium meyenii</i> depende del receptor CB1	44
3.3.2.4. Posible mecanismo de acción de <i>Lepidium meyenii</i>	45
4. Capítulo IV: Conclusiones	47
4.1 Humanos	47
4.2. Animales	47
4.3. Sugerencias	48
5. Referencias bibliográficas	49

Índice de tablas

Tabla 1. Metabolitos presentes en hipocótilos secos según variedad.	12
Tabla 2. Algunas propiedades diferenciales de <i>Lepidium meyenii</i> según el fenotipo	12
Tabla 3. Metabolitos analizados y rutas metabólicas a los que pertenecen.....	19
Tabla 4. Relación de endocannabinoides con metabolitos precursores.	25
Tabla 5. Relación de variables fisiológicas y endocannabinoides a diferente altitud.....	28
Tabla 6. Valores basales de metabolitos según procedencia.	29
Tabla 7. Relación de eCBs y eicosanoides en la población general y por departamento. ...	30
Tabla 8. Valores diferenciales de eicosanoides a diferente altitud.	31
Tabla 9. Valores basales y finales de metabolitos según tratamiento.....	32

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo del estudio en humanos.	17
Figura 2. Diagrama de flujo del estudio en animales.	22
Figura 3. Relación de PEA con variables biológicas.	26
Figura 4. Relación de OEA con variables biológicas.	26
Figura 5. Relación de LEA con variables biológicas.	27
Figura 6. Relación de SEA con variables biológicas.	27
Figura 7. Pesos corporales de animales de experimentación.	33
Figura 8. Peso de órganos reproductivos.	34
Figura 9. Producción diaria y conteo de espermatozoides según tratamiento.	36
Figura 10. Efecto de los distintos tratamientos sobre el retardo en fatiga medido mediante la prueba de nado forzado.	37
Figura 11. Esquema de producción de eritrocitos y mastocitos y efecto de altura y eCBs.	41
Figura 12. Posible mecanismo de acción de <i>Lepidium meyenii</i>	46

Abreviaturas

2-AG	2-araquidonoilglicerol	Hpalm	2-hidroxiipalmitato
AA	Ácido araquidónico	IL3	Interleuquina 3
ADN	Ácido desoxirribonucleico	LB4	Leucotrieno B4
AEA	Anandamida	LEA	Linoleoil etanolamida
AG	1-araquidonilglicerol	LLGa	1-linolenoilglicerol (18:3)
BW	Peso corporal	LLGb	1-linoleoilglicerol (18:2)
CB1	Receptor cannabinoide 1	MAGL	Monoacilglicerol lipasa
CB2	Receptor cannabinoide 2	M-CSF	Factor de crecimiento de colonias de mastocitos
CDE	Conteo diario de espermatozoides	m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
DAG	Diacil glicerol	MMC	Mal de Montaña Crónico
DAGL	Diacil glicerol lipasa	MN	Maca negra
DHG	1-docosahexaenoilglicerol	NAPE	N-acilfosfatidil etanolamida
DSE	Supresión de la excitación inducida por despolarización	NAPE PLD	Fosfolipasa D específica para N-acilfosfatidil etanolamida
eCB	Endocannabinoide	OEA	Oleoil etanolamida
EPO	Eritropoyetina	OEAG	1-oleoilglicerol
FAAH	Hidrolasa de ácidos grasos amídicos	PAG	1-palmitoilglicerol
GABA	Ácido γ -aminobutírico	PE	Fosfoetanolamina
G-CSF	Factor de crecimiento de colonias de granulocitos	PEA	Palmitoil etanolamida
GLiPE	Glicerofosfoetanolamina	PIP2	Inositol bifosfato
GPCR	Receptor acoplado a proteína G	rpm	Revoluciones por minuto
Hb	Hemoglobina	SEA	Estearoil etanolamida
HEPE	Ácido 5-hidroxiicosanopentanoico	SpO₂	Saturación de oxígeno de pulso
Hester	2-hidroxiestearato	THC	Δ^9 Tetrahidrocannabinol
HETE	Ácido 5-hidroxiicosatetraenoico	TI	Tiempo de inmovilización
HGF	Factores de crecimiento hematopoyético	TM	Tiempo en movimiento
HODE	Ácido 13-hidroxi-9, 11-octadecadienoico + ácido 9-hidroxi-10, 12-octadecadienoico	TT	Tiempo total
		VO₂ max	Consumo máximo de oxígeno

1. Capítulo I: Introducción

El Sistema endocannabinoide se consolidó como tal después de que se descubriese el receptor cannabinoide 1 (CB1) (Devane *et al.*, 1988) tras los esfuerzos por encontrar el responsable de los efectos del principio activo de la marihuana (*Cannabis sativa*), Δ^9 tetrahidrocannabinol (THC). Poco después se describió el ligando endógeno de este receptor, la anandamida o N-araquidonoil etanolamida y el aparato enzimático detrás del sistema. Entre las enzimas responsables de la degradación de la anandamida, está la hidrolasa de ácidos grasos amídicos (FAAH) (Alger, 2012).

Este sistema está envuelto en una gran variedad de funciones biológicas, entre las que destacan la regulación de la liberación de neurotransmisores (Ohno-Shosaku *et al.*, 2001; Kano, 2014), la activación espermática (Miller *et al.*, 2016), la homeostasis (Osei-Hyiaman *et al.*, 2006), la modulación del dolor (Hohmann & Suplita *et al.*, 2006) y la inflamación (Centonze *et al.*, 2007).

Un aspecto resaltante de este sistema es que los endocannabinoides son liberados solo ante un estímulo y no existen vesículas especiales que los almacenen de manera que son rápidamente degradados después de cumplir su función por enzimas especializadas como FAAH.

Por esta razón, se han evaluado inhibidores de esta enzima para tratar diversas condiciones patológicas como el dolor inflamatorio (Booker *et al.*, 2012) y la presión arterial alta (Toczek *et al.*, 2016).

Se han identificado compuestos únicos en la maca (*Lepidium meyenii*) capaces de inhibir selectivamente esta enzima (Wu *et al.*, 2013; Hajdu *et al.*, 2014). La maca es una planta peruana usada con fines terapéuticos desde hace siglos en el Perú (Gonzales, 2013).

Una rápida revisión de las propiedades biológicas de la maca nos muestra que su accionar es sobre áreas donde el sistema endocannabinoide (eCB) tiene implicancia por haber gran densidad de receptores CB1 expresados: en el sistema nervioso donde la maca mejora la memoria, (Rubio *et al.*, 2006), en el sistema reproductivo donde la maca aumenta la

producción de espermatozoides (Gonzales C., *et al*, 2006) y en el sistema inmune sobre el que la maca actúa al aumentar los niveles de interferón gamma actuando como inmunomodulador (Leiva-Revilla *et al.*, 2013).

Sin embargo, hasta ahora no se ha determinado el mecanismo de acción por el cual la maca ejerce sus efectos.

El sistema endocannabinoide tiene importantes efectos en la regulación de la homeostasis y es considerado un sistema de respuesta frente al estrés central y periférico y frente a estímulos físicos y emocionales (Strewe *et al.*, 2012).

Este proyecto tiene por objeto evaluar la relación existente entre las propiedades biológicas de la maca y el sistema endocannabinoide. Para esto se ha diseñado un estudio en humanos y otro en animales.

En el estudio en humanos se evaluaron los metabolitos pertenecientes al sistema endocannabinoide antes y después del consumo de maca en mujeres y hombres adultos de Lima y Puno. Puesto que Puno está ubicado a 3800 m.s.n.m. y representa un ambiente de estrés hipóxico, se espera encontrar patrones diferentes de endocannabinoides en los sujetos estudiados en comparación con los que habitan en la costa, así mismo; evaluar cómo varía este patrón tras el consumo de maca.

El estudio en animales ha sido diseñado para determinar si el receptor cannabinoide 1 (CB1) es importante en la respuesta biológica de la maca en ratones macho adultos; para esto se bloqueó farmacológicamente el receptor usando un fármaco antagonista selectivo disponible en el mercado (AM251).

1.1. Propósito del estudio

Basados en datos previos que sugieren que las macamidas contenidas en *Lepidium meyenii* tendrían un efecto inhibitor de la hidrolasa de ácidos grasos amídicos y, por tanto, un efecto modulador del sistema endocannabinoide, esta tesis busca -mediante dos estudios distintos; uno en humanos y otro en animales- aportar al conocimiento brindando datos que ayuden a dilucidar cómo se da esta modulación.

El estudio en humanos evalúa metabolitos relacionados al sistema endocannabinoide en condiciones normales (Lima, 150 m.s.n.m.) y en condiciones de estrés fisiológico producido por la hipoxia de altura (Puno, 3800 m.s.n.m.). Los voluntarios tendrán un tratamiento con maca durante tres meses y se analizó si los metabolitos variaron como consecuencia del tratamiento.

El estudio en animales busca determinar si los efectos de *Lepidium meyenii* están relacionados o no al funcionamiento del receptor cannabinoide 1 (CB1). Para esto se ha diseñado un ensayo donde se bloquee farmacológica y selectivamente este receptor; y se evalúa si los efectos de maca en la mejora de los parámetros espermáticos y en el retardo del tiempo de fatiga persisten después bloqueado el receptor CB1.

1.2. Antecedentes existentes

1.2.1. El sistema endocannabinoide

El estudio del sistema endocannabinoide está inherentemente ligado al estudio de *Cannabis sativa*, planta psicotrópica usada por siglos y que continúa siendo la droga recreativa más usada en el mundo.

Pese a que el primer registro del uso de marihuana en la historia data de hace más de 4500 años en China, fue recién a mediados de los años 60 en Israel cuando se sintetizó el compuesto químico responsable de la fama y extendido uso de esta planta (Mechoulam & Gaoni, 1964).

Un cuarto de siglo después, en pleno auge del consumo desmesurado de estupefacientes, los gobiernos de las potencias mundiales destinan generosos recursos para frenar y tratar la adicción a las drogas.

En este contexto, William Devane, un estudiante de doctorado de la Universidad de St. Louis describe en su tesis la presencia de receptores cannabinoideos en la corteza cerebral de ratas (Devane, 1989). Además, al lograr disociar el ligando del sitio de unión con mayor velocidad con una guanina, logró caracterizar al receptor como uno asociado a proteína G pues esta característica es propia de la regulación alostérica de este tipo de receptores (Devane *et al.*, 1988).

Después de este descubrimiento, Devane y su equipo de investigación se enfrascaron en la búsqueda del ligando endógeno que se uniera a este receptor, para esto realizaron una serie de experimentos con extractos de cerebro de ratón, con el objetivo de encontrar un compuesto químico capaz de desplazar la unión de un fármaco. Pronto lo encontraron y lo nombraron N-araquidonoil etanolamida o anandamida (AEA) un derivado de ácido araquidónico (Devane *et al.*, 1992).

Todo ese decenio representó un crecimiento vertiginoso en el estudio de este sistema. Los investigadores avocados a él empezaron a preguntarse dónde estaba ubicado este receptor y obtuvieron numerosas respuestas ya que CB1 se encuentra en la amígdala cerebral (Katona *et al.*, 2001), en el corazón (Bonz *et al.*, 2003), en las células vasculares endoteliales (Liu *et al.*, 2003), en el tracto gastrointestinal (Pertwee *et al.*, 2001), en la próstata (Ruiz-Llorente *et al.*, 2003), testículos (Gye *et al.*, 2005), ovarios (Galiègue *et al.*, 1995), útero (Paria *et al.*, 1995), osteoblastos y osteoclastos (Idris *et al.*, 2005) y en las células del sistema inmune; en esta última población celular se logró identificar otro receptor cannabinoide al que se le conoce como CB2 que se expresa en grandes densidades (Schatz *et al.*, 1997).

CB1 y CB2 no sólo difieren en su localización, sino en la secuencia del ADN que los codifica. La baja similaridad sugiere una duplicación génica en un ancestro en común que permite la existencia de dos receptores que comparten ligandos y funciones pero difieren genéticamente y en su ubicación (Elphick, 2012).

Es preciso recalcar que los receptores cannabinoideos no son una exclusividad mamífera, ni mucho menos vertebrada. Han sido encontrados receptores en *Drosophila melanogaster* (Howlett *et al.*, 2000); en *Hydra vulgaris* (De Petrocellis *et al.*, 1999) y en *Mytilus edulis* (Stefano *et al.*, 1996) entre otros invertebrados mientras que en el filo de los vertebrados hay presencia de este receptor en *Gallus gallus* (Stincic *et al.*, 2008); en el cerebro del anfibio *Xenopus leavis* (Salio *et al.*, 2002) y en el pez teleosteo africano *Pelvicachromis pulcher* (Cottone *et al.*, 2005).

1.2.1.1. Receptores acoplados a proteína G.

Los receptores acoplados a proteína G son una gran familia de proteínas que transfieren un estímulo externo a segundos mensajeros intracelulares que son capaces de interpretar este estímulo en información para la célula. Su nombre se debe a que para realizar esta función interactúan con proteínas G heterotriméricas; esto es, proteínas que se unen al nucleótido guanina (Ferguson, 2001).

Un aspecto sobresaliente de estos receptores es que actúan sobre una gran diversidad de tipos celulares y por esto son una diana farmacéutica formidable.

El 2004, Filmore afirmaba que un 40% de las drogas prescritas en el mercado ejercen su función a través de estos receptores, otros autores dan cifras de hasta 60% (Ghanemi, 2015).

Estos fármacos están en el núcleo de la medicina contemporánea pues son usados para tratar desde el cáncer hasta problemas de obesidad, hipertensión y otros asociados a síndrome metabólico (Filmore, 2004).

Este panorama, a pesar de la década que ha devenido, no ha cambiado; al contrario, se ha ampliado pues ahora no sólo se buscan agonistas o antagonistas, sino que estos receptores permiten una gran cantidad de perfiles farmacológicos conocidos como selectividad funcional, que nos llevaría a drogas mucho más certeras, efectivas y selectivas. (Violin *et al.*, 2014).

1.2.1.2. Maquinaria enzimática y síntesis de endocannabinoides

La naturaleza lipídica de los endocannabinoides define su ruta enzimática. A diferencia de otras moléculas que cumplen similar función, los neurotransmisores por ejemplo; los endocannabinoides no se almacenan en vesículas pues son hidrofóbicas y su captura para posterior almacenaje no sería un proceso estable (Ahn *et al.*, 2008).

Se ha propuesto un modelo a demanda de liberación de endocannabinoides; es decir, sólo se liberan en respuesta a un determinado estímulo nervioso para ejercer su función y ser finalmente degradados (Ahn *et al.*, 2008; Alger, 2012).

Una acil transferasa calcio dependiente inicia el proceso de síntesis de anandamida al transferir ácido araquidónico (AA) de un fosfolípido a una fosfatidil etanolamina formando así la N-araquidonoil fosfatidil etanolamida (NAPE) que posteriormente es hidrolizada por una enzima específica (NAPE PLD) para dar lugar a la N-araquidonoil etanolamida o anandamida (Kauzer & Marnett, 2011).

Por otro lado, fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato (PIP₂) es hidrolizado a diacil glicerol (DAG) por una fosfolipasa (PLC). Posteriormente una lipasa específica (DAGL) se encarga de la hidrolisis final que da como resultado el 2-araquidonoil glicerol (2-AG), el segundo endocannabinoides clásico descubierto.

La ruta de degradación para estos endocannabinoides tiene como principal enzima a la hidrolasa de ácidos grasos amídicos (FAAH) (Dihn *et al.*, 2002).

1.2.1.3. Hidrolasa de ácidos grasos amídicos

La primera descripción de la actividad hidrolítica de AEA por FAAH fue dada por Deutsch & Chin (1993) quienes demostraron que la anandamida sintetizada en células de neuroblastoma era rápidamente degradada por una amidasa específica que se encontraba en grandes cantidades en todos los tipos celulares que evaluaban, incluidas células de glioma.

FAAH es una serin hidrolasa unida a membrana que además de degradar AEA y 2-AG degrada una serie de ácidos amídicos (Ueda *et al.*, 2013).

El sitio catalítico de esta enzima está compuesto de múltiples cavidades con características hidrofóbicas e hidrofílicas cuyo rol aún es esquivo pero se ha sugerido que AEA entra a una de estas cavidades a través de un canal de acceso de membrana especial y posiciona la porción grasa de su cadena en una zona altamente hidrofóbica donde finalmente ocurre la hidrólisis (Palermo *et al.*, 2013).

Al igual que los receptores cannabinoideos, FAAH ha sido conservada evolutivamente y se ha encontrado hasta en *Dictyostelium discoideum*, un protozoo ameboide muy primitivo (Hayes *et al.*, 2013).

1.2.1.4. El rol de la anandamida y el receptor CB1 en los sistemas fisiológicos

El receptor CB1 está mayormente expresado en los sistemas nervioso y reproductivo, mientras que el receptor CB2 se encuentra principalmente en células del sistema inmune. Tal distribución es suficiente preámbulo para poder inferir el rol significativo que juegan en mencionados sistemas.

En el sistema reproductivo, hay receptores CB1 en útero (Dmitrieva *et al.*, 2002), testículos (Ricci *et al.*, 2007), próstata (Tokanovik *et al.*, 2007), epidídimo (Ricci *et al.*, 2007) y espermatozoides (Rossato *et al.*, 2005). Sin embargo, el rol del receptor continúa siendo elusivo, hay muchos datos conflictivos respecto a su función.

Rossato (2005) afirma que la activación del receptor CB1 por la anandamida en espermatozoides reduce la motilidad espermática e inhibe la reacción acrosómica inducida por la capacitación; no obstante, en un estudio en humanos, Amoako y coautores (2013) midieron los niveles de AEA en plasma seminal de hombres normospermicos, astenozoospermicos y oligoastenoteratozoospermicos y encontraron que en hombres con parámetros espermáticos patológicamente anormales, los niveles del endocannabinoide eran significativamente inferiores comparados al grupo normal.

Resultado que entra en clara oposición a lo encontrado por Rossato, pues si la activación de este receptor es incompatible con la fertilización, quienes tendrían niveles elevados de AEA serían los hombres con patologías reproductivas.

Sin embargo la relevancia del tono endocannabinoide en los procesos reproductivos, parece ser más extensa, recientemente se ha publicado y constituye un hito en la fisiología de la reproducción, el accionar no genómico de los esteroides que está ligado a una señalización no convencional de los endocannabinoides (Miller *et al.*, 2016).

El otro sistema fisiológico que depende del tono endocannabinoide es el sistema nervioso; hay receptores cannabinoideos en el hipocampo, hipotálamo, neuronas etc., y el rol que cumpliría es el control de la función sináptica (Alger, 2012).

Elphick & Egertová (2001) propusieron un modelo donde la anandamida sintetizada por las células post-sinápticas actúa como mensajero retrógrado, es decir, viaja a la célula pre sináptica para modular la liberación de neurotransmisores de los terminales pre-sinápticos en un proceso conocido como DSI o supresión de la inhibición mediada por despolarización; se llamó inhibición porque el neurotransmisor suprimido era ácido γ amino butírico (GABA) responsable de sinapsis inhibitorias, pero también se describió similar mecanismo para la supresión de corrientes glutamatérgicas (excitatorias) en un proceso conocido como supresión de la excitación mediada por despolarización (DSE) (Alger, 2012; Trattner *et al.*, 2013).

Por esta razón se considera que el efecto más importante de los endocannabinoides en el sistema nervioso es controlar la sinapsis mediante estos dos procesos.

1.2.1.5. Otros endocannabinoides de importancia

Las etanolamidas evaluadas en el estudio metabolómico comparten vías sintéticas con los endocannabinoides clásicos, en el caso de palmitoil etanolamida (PEA) y oleoil etanolamida (OEA), son capaces de unirse al receptor CB1 con afinidad más baja que anandamida (AEA) pero actúan todas promoviendo el tono endocannabinoide al evitar que AEA sea degradada por un efecto conocido como “*entourage effect*” (Lámbert & Di Marzo, 1999; Capasso *et al.*, 2012).

La más estudiada de todas es PEA, que tiene un potencial antiinflamatorio, antinociceptivo e hipotensor significativo (Gagliano *et al.*, 2011).

1.2.2. La vida en las alturas

Vivir sobre los 2000 metros sobre el nivel del mar representa un desafío para cualquier ser vivo, ya que se debe soportar una menor disponibilidad de oxígeno para el intercambio gaseoso en los pulmones (Peacock, 1998). A medida que la altura aumenta, la presión parcial de oxígeno disminuye de manera proporcional. Hay un 40% menos presión parcial de oxígeno a los 4500 m.s.n.m que a nivel del mar (Frisancho, 2013) y las implicancias fisiológicas de esta situación se hacen evidentes cuando una persona es expuesta de manera aguda a la altura; dolores de cabeza, mareos, náusea y problemas para dormir son síntomas comunes del mal de montaña agudo.

Un incremento en la frecuencia cardíaca e hiperventilación constituyen mecanismos de respuesta rápida antes el estrés fisiológico sufrido conocidos como mecanismos de acomodación (Gonzales, 2013).

Una permanencia crónica en altura conlleva a un aumento en producción de eritrocitos (eritrocitosis) en un mecanismo conocido como aclimatación; mientras que una exposición generacional a hipoxia de altura produce variantes genéticas que sólo se encuentran en determinadas poblaciones en el mundo como los etíopes, los tibetanos y los aymaras y constituyen mecanismos de adaptación (Gonzales & Chaupis, 2015).

1.2.2.1. Mal de montaña crónico

Una mala adaptación a las condiciones de hipoxia de altura conllevan a una patología conocida como mal de montaña crónico o Enfermedad de Monge (León-Velarde *et al.*, 2005).

Esta patología está caracterizada por dolores persistentes de cabeza, cianosis, *tinnitus* o zumbido en los oídos, problemas para conciliar el sueño, problemas de respiración y, sobre todo, eritrocitosis excesiva, medida como una concentración de hemoglobina mayor a 19 g/dL en mujeres y 21 g/dL en hombres (León-Velarde *et al.*, 2005).

Se han descrito varios posibles mecanismos detrás de la eritrocitosis excesiva como mecanismos endocrinos, a través de andrógenos y la eritropoyetina (EPO) (Gonzales & Chaupis 2015) que favorecen la producción de células sanguíneas.

El tiempo generacional de exposición a la altura es considerado el principal factor detrás de la patofisiología del mal de montaña crónico. Por ejemplo, en la meseta del Tibet, hay dos poblaciones que viven a la misma altura pero los del grupo étnico Han apenas han estado en esas condiciones un poco menos de 80 años (Wu *et al.*, 2005), mientras que los tibetanos tienen hasta 1100 generaciones viviendo en altura (Wang *et al.*, 2013).

Escenario similar se presenta en el Perú. Los Aymaras del sur peruano tienen mayor tiempo generacional que los Quechuas de los Andes centrales (Hartinger *et al.*, 2006).

En las poblaciones con menor tiempo generacional (Han y Quechuas de Andes centrales) la prevalencia de eritrocitosis excesiva es mayor que en las poblaciones más adaptadas (De Ferrari *et al.*, 2014; Niermeyer *et al.*, 2015).

1.2.2.2 Funcionamiento del Sistema Endocannabinoide en condiciones de hipoxia

Los mecanismos de la adaptación a la altura no han sido plenamente dilucidados y al ser los endocannabinoides encargados de la homeostasis, es presumible inferir que podrían estar relacionados. Especialmente después de los reportes de Feuerrecker *et al.* (2012) quienes comprueban que en estrés hipóxico, hay una activación de la actividad endocannabinoide y un incremento en los niveles circulantes de anandamida (AEA) en sujetos expuestos a ejercicio en altura.

Xiao *et al.* (2014) reportan un aumento en la actividad del receptor CB1 en condiciones de hipoxia en ratas expuestas a cámaras hipobáricas.

No hay más estudios que se dediquen a indagar a fondo la relación entre el sistema eCB y la adaptación a altura, aun cuando hay datos indirectos que sugieren una relación importante.

En altura hay desaturación de oxígeno durante el sueño seguida de episodios de apnea/hipopnea más seguidos (Torre-Bouscoulet *et al.*, 2007; Richalet *et al.*, 2005). La anandamida está aumentada en personas que sufren apnea del sueño obstructiva. (Engeli *et al.*, 2012).

AEA también media la vasoconstricción pulmonar hipóxica (Wenzel *et al.*, 2013) que en altura se ve incrementada.

1.2.3. *Lepidium meyenii* y su rol en el sistema endocannabinoide

La maca o *Lepidium meyenii* es un hipocótilo peruano que crece exclusivamente sobre los 4000 metros sobre el nivel del mar en los Andes Centrales Peruanos. Tiene propiedades fitoterapéuticas que han sido ratificadas por la ciencia, la más conocida es su capacidad de mejorar la fertilidad mediante la mejora significativa de los parámetros espermáticos, mejora la motilidad, el conteo espermático y la espermatogénesis (Gonzales *et al.*, 2001).

No tardaron en describirse propiedades en el sistema nervioso, la maca restablece la memoria en diferentes modelos animales en los que se induce la pérdida de memoria mediante etanol o escopolamina (Rubio *et al.*, 2011), tiene efectos neuroprotectores (Pino Figueroa *et al.*, 2013), disminuye la depresión (Rubio *et al.*, 2006) y promueve el aprendizaje (Rubio *et al.*, 2011).

La maca se presenta de manera natural en diferentes fenotipos fácilmente distinguibles por el color externo de los hipocótilos. Se tiene conocimiento de una gama amplia de variedades desde una insípida maca blanca, hasta la que toma colores que denotarían su alto contenido en antocianinas al estar teñidas de un morado resaltante; sin embargo, sólo se han estudiado las propiedades biológicas de tres variedades: la amarilla, la roja y la negra.

Datos de resonancia magnética nuclear (datos propios, aún no publicados) muestran que los metabolitos presentes en los tres tipos de maca no varían, la diferencia reside en las proporciones de los mismos (Tabla 1).

Se ha demostrado también que las propiedades de la maca difieren según la variedad o el fenotipo. En la tabla 2 se presentan las propiedades de la maca según su color.

Tabla 1. Metabolitos presentes en hipocótilos secos según variedad.

Compuesto	Maca negra	Maca roja	Maca amarilla
Ácido fórmico	4.52	6.05	6.41
Ácido fumárico	18.78	25.98	22.16
Ácido málico	91.99	118.03	109.96
Ácidos grasos	370.51	410.41	419.05
Adenina	4.12	4.97	4.39
Alanina	174.05	151.06	165
Colina	256.68	263.34	281.97
Fitoesteroles	24.82	26.06	27.95
GABA	96.24	78.93	96.52
Glucotropalina	53.69	49.98	54.71
Glutamina	80.66	78.83	83.99
Macamidas	37.72	41.23	45.05
Prolina	834.27	1203.19	1190.66
Sucrosa	590.88	585.48	582.85
Uridina	8.35	6.67	7.7
Valina	95.7	82.42	97.58

Valores medidos por resonancia magnética nuclear. Son intensidades relativas de los picos característicos de los compuestos al punto de referencia interno.

Tabla 2. Propiedades de *Lepidium meyenii* según el fenotipo externo.

Variedad	Propiedad	Referencia
Negra	Espermatogénesis	<i>Gonzales et al., 2006</i>
	Mejora memoria	<i>Rubio et al., 2011</i>
	Retarda fatiga	<i>Gonzales et al., 2004</i>
	Aumenta conteo espermático epidídimo	<i>Gasco et al., 2007</i>
	Antidepresivo	<i>Rubio et al., 2006</i>
Roja	Anti osteoporosis	<i>Gonzales et al., 2004</i>
	Aumenta Interferón γ	<i>Leiva-Revilla et al., 2015</i>
	Antihiperplástico (próstata)	<i>Gasco et al., 2007</i>
	Antidepresivo	<i>Rubio et al., 2006</i>
Amarilla	Aumenta SC epidídimo	<i>Gasco et al., 2007</i>
	Antidepresivo	<i>Gasco et al., 2007</i>

Entre los componentes de la maca, un grupo especial de amidas fue identificado y dado que su presencia se circunscribía únicamente al hipocótilo andino, se las bautizó como “macamidas” (Zheng *et al.*, 2000).

Los estudios realizados a las macamidas han permitido trazar un interesante lazo entre su funcionamiento y el accionar del sistema endocannabinoide.

Se ha determinado que las macamidas son capaces de inhibir la hidrolasa de ácidos grasos amídicos (FAAH). Wu y coautores (2013) han caracterizado el potencial inhibitorio de 11 diferentes macamidas a través de ensayos *in vitro* concluyendo que, si bien es cierto, las macamidas presentan este efecto inhibitorio, el potencial de éste dependerá de la identidad de la macamida.

Almukadi y coautores (2013) describieron la capacidad inhibitoria de FAAH exhibida por una macamida, N-3-metoxibenzil-linoleamida, la cual inhibe FAAH de una manera dosis y tiempo dependiente; el mecanismo de inhibición sería irreversible o lentamente reversible.

Hajdu y colegas (2014) describieron 3 macamidas con potencial inhibitorio de la hidrolasa de ácidos grasos amídicos. Especialmente N-benzil-(9Z, 12Z) octadecadinamida que además de ser un inhibidor de FAAH, mimetiza a los endocannabinoides incluso a concentraciones micromolares y submicromolares, así mismo, favorece la recaptura de anandamida y también se une selectivamente a los receptores cannabinoideos (al receptor CB1 con 9 veces más selectividad que al CB2).

La acción inhibitoria de las macamidas evitaría que los cannabinoides endógenos sean degradados permitiendo que su circulación sea más prolongada mejorando el tono endocannabinoide.

1.3. Situación actual de la investigación

El estudio del sistema endocannabinoide está en pleno auge; son numerosas las recientes publicaciones que reportan su implicancia en situaciones patológicas y la importancia de su regulación. No se ha estudiado hasta el momento su relación con la patología del mal de montaña crónico ni con una posible adaptación a la altura.

Los estudios en maca han llegado a un techo, no se ha logrado identificar un único compuesto activo que logre la totalidad de efectos alcanzados por la maca como un todo, y los denodados esfuerzos por lograr que el conocimiento tradicional dé a luz propiedad intelectual altamente rentable sólo ha terminado en la patente de extractos de la planta (Zheng *et al.*, 2001) o mezclados con extractos de otras plantas (Gonzales & Gonzales, 2011) y el desconocimiento del mecanismo de acción ha impedido la obtención de un fármaco a base de maca.

Los receptores acoplados a proteína G se han convertido rápidamente en una diana terapéutica de gran importancia, al igual que los inhibidores sintéticos de FAAH, que vienen siendo probados con éxito en pruebas para tratar condiciones patológicas como la presión alta (Godlweski *et al.*, 2010, Baranowska-Kuczko *et al.*, 2016) el dolor inflamatorio (Booker *et al.*, 2012), el dolor visceral (Sakin *et al.*, 2015) y también ha demostrado mejorar la capacidad antitumorgénica de la anandamida en células cancerosas (Ravi *et al.*, 2014).

Es en este contexto que la evaluación del rol de la maca en la modulación del sistema endocannabinoide sería de gran importancia no sólo porque nos da luces de su mecanismo de acción y de entender su rol pleiotrópico sino porque también abre las puertas a muchas posibilidades de generación de nuevos productos con valor agregado que serán de mucha significancia para el país.

1.4. Hipótesis

1.4.1. Humanos

Los patrones de endocannabinoides (palmitoil etanolamida, oleoil etanolamida, estereoil etanolamida y lineoil etanolamida) son diferentes en la población de Puno frente a Lima y se ven modificados tras la ingesta de maca.

1.4.2. Animales

La respuesta biológica de la maca en parámetros espermáticos y nado forzado en ratones macho adultos depende del receptor cannabinoide 1.

1.5. Objetivos

1.5.1. General

Determinar si la maca (*Lepidium meyenii*) modula el sistema endocannabinoide mediante la medición de metabolitos asociados a este sistema en humanos expuestos y no expuestos a estrés hipóxico y mediante el bloqueo del receptor CB1 en modelos experimentales en ratones macho adultos.

1.5.2. Específico

1.5.2.1. Humanos

- Analizar los patrones basales de los metabolitos de interés en el sistema endocannabinoide en pobladores de Puno y Lima.
- Evaluar la relación de los niveles de endocannabinoides con variables fisiológicas afectadas por la hipoxia de altura: hemoglobina, hematocrito, saturación parcial de oxígeno y presión arterial sistólica.
- Evaluar si la ingesta de maca altera los niveles basales de endocannabinoide en pobladores de Puno y Lima.

1.5.2.2. Animales

- Evaluar si el bloqueo farmacológico de CB1 inhibe las propiedades de *Lepidium meyenii* sobre los parámetros espermáticos en ratones macho adultos.
- Evaluar si el bloqueo farmacológico de CB1 inhibe las propiedades de *Lepidium meyenii* sobre la fatiga medida en la prueba de nado forzado en ratones macho adultos.

2. Capítulo II. Materiales y métodos

2.1. Estudios en humanos

Se usaron datos obtenidos del proyecto “Patrones de Consumo alimentario, estado nutricional y características metabólicas del habitante a nivel del mar y altura del Perú” (SIDISI 61697).

Estudio aleatorizado, controlado por placebo y doble ciego pues tanto el investigador, como el personal de apoyo y el voluntario desconocían el tratamiento que se les había asignado hasta el final de estudio. En la Figura 1 se muestra el diagrama de flujo del estudio.

2.1.1. Criterios de inclusión y exclusión

El estudio incluyó a hombres y mujeres entre 18 a 65 años, de buena salud que no hayan tenido enfermedad los últimos tres meses previos al inicio del tratamiento ni estén sujetos a medicación permanente.

Se excluyeron a mujeres embarazadas o con amenorrea no relacionada a embarazo o menopausia, fumadores crónicos, personas que refieran tener dislipidemia, diabetes mellitus, o síndrome metabólico.

De igual manera se excluyó a sujetos con presión arterial sistólica mayor a 140 mmHg y/o presión arterial diastólica mayor a 100 mmHg y personas con glucosa en ayunas mayor a 140 mg/dL.

2.1.2. Consentimiento informado

Los voluntarios fueron informados del propósito, los procedimientos, posibles riesgos y beneficios de participar en el estudio.

Si estaban de acuerdo con participar firmaban el formato de consentimiento informado (Anexo 1) aprobado por el Comité Institucional de ética en humanos de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

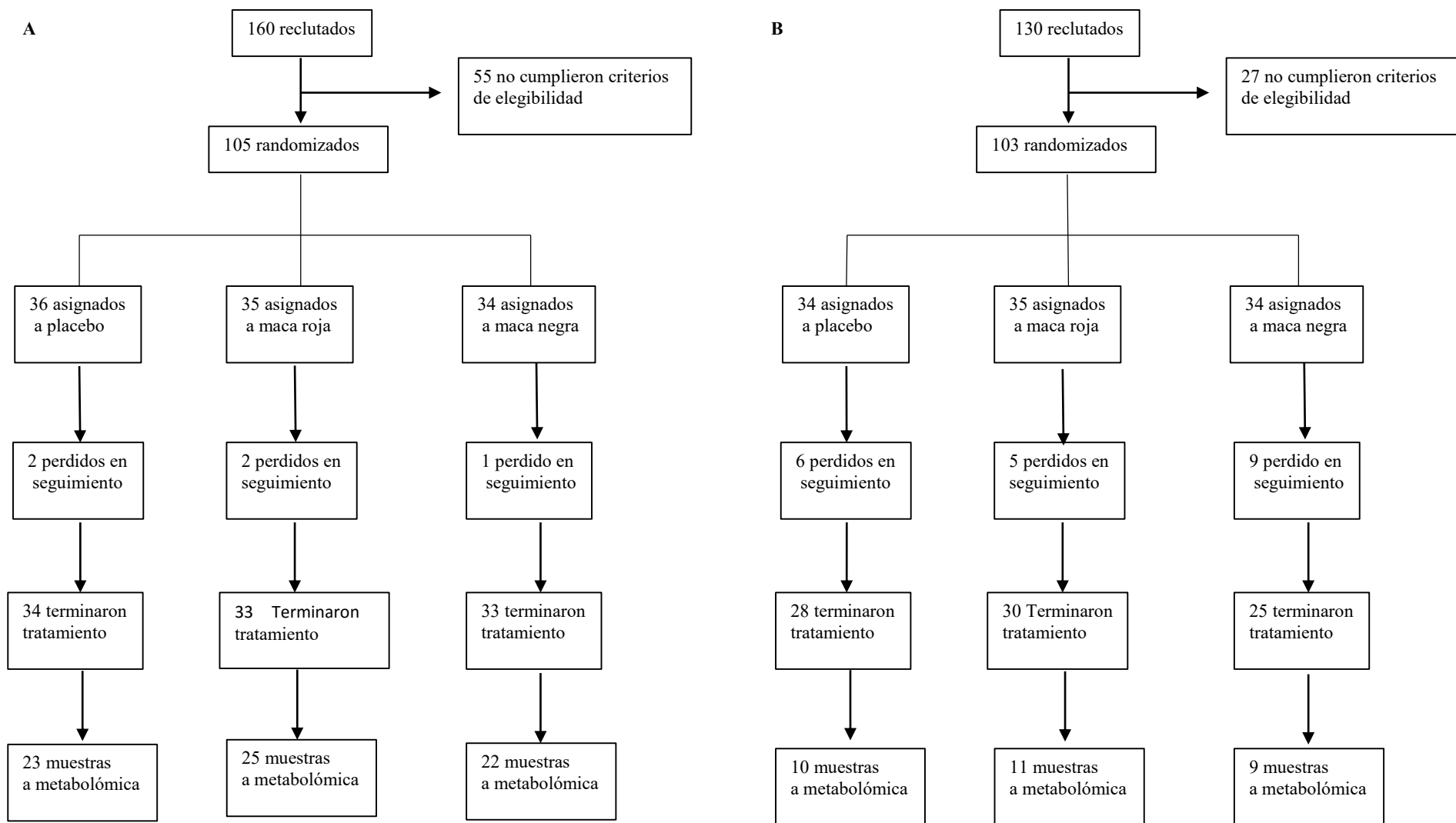


Figura 1. Diagrama de flujo del estudio en humanos. Reclutamiento y seguimiento de tratamiento de los voluntarios del estudio de metabolómica en A: Puno y B: Lima.

2.1.3. Variables analizadas

Se extrajo una muestra de sangre de 15 mL en ayunas el día de reclutamiento a quienes aceptaron formar parte del estudio y cumplían los criterios de inclusión. También se midió *in situ* la presión arterial y saturación de oxígeno de pulso.

Para la medición de la hemoglobina se hace una punción al dedo índice del sujeto con una lanceta, se descarta la primera gota de sangre, la segunda se usa para la medición de hemoglobina mediante el HemoCue system (Anglholm, Sweden), inmediatamente se coloca un capilar hasta llenar de fluido sanguíneo las dos terceras partes del mismo, se coloca en una plastilina y se centrifuga por 5 minutos a 3000 RPM, se mide el porcentaje de la porción forme en relación del total; este es el valor del hematocrito, expresado en porcentaje.

Las muestras de sangre fueron enviadas a Metabolon® (Carolina del Norte, Estados Unidos) donde se hizo el *profiling* metabólico de cada muestra mediante cromatografía líquida de alta performance. Los metabolitos analizados y las rutas metabólicas a las que pertenecen se muestran en la tabla 3.

2.1.4. Tratamiento y duración

Todas las personas enroladas tuvieron un tratamiento de 3 meses con alguno de los siguientes tratamientos:

1. Extracto hidroalcoholico atomizado de maca negra
2. Extracto hidroalcoholico atomizado de maca roja
3. Placebo: Maltodextrina

Estos tratamientos fueron administrados en sachets de 3 gramos c/u con una codificación que ocultaba su identidad tanto para el voluntario como para el investigador; es decir el estudio fue doble ciego.

Tabla 3. Metabolitos analizados y rutas metabólicas a los que pertenecen.

Metabolito	Abreviatura	Ruta metabólica
Ácido araquidónico	AA	Ácido graso, precursor de eicosanoides
Leucotrieno B4	LB4	Eicosanoides
5-HEPE	HEPE	
5-HETE	HETE	
1-araquidonilglicerol	AG	Precusores de endocannabinoides
1-docosaheptaenoilglicerol	DHG	
1-linoleoilglicerol (18:3)	LLGa	
1-linoleoilglicerol (18:2)	LLGb	
1-oleoilglicerol	OEAG	
1-palmitoilglicerol	PAG	
13-HODE + 9-HODE	HODE	
Fosfoetanolamina	PE	
Glicerofosfoetanolamina	GliPE	
2-hidroxi palmitato	Hpalm	
2-hidroxiestearato	Hester	
Oleoil etanolamida	OEA	Endocannabinoides
Palmitoil etanolamida	PEA	
Estearoil etanolamida	SEA	
Linoleoil etanolamida	LEA	

2.1.5. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el software STATA 12. Se consideró estadísticamente significativo un $p < 0.05$.

Se presentan los datos como medias \pm error estándar. Se evaluó la relación de los niveles de endocannabinoides con los niveles de ácidos grasos precursores, eicosanoides y variables fisiológicas mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Se presenta el valor de p para cada análisis. Para la evaluación de endocannabinoides con ácidos grasos precursores se usó la corrección de Bonferroni al ser múltiples las comparaciones realizadas.

Los valores iniciales y finales se compararon mediante una prueba de t de dos colas; el valor exacto de p es consignado para cada análisis. En ciertos casos se usó la prueba de t de 1 cola y es descrito en el resultado del análisis.

El efecto del tratamiento en los niveles de los diferentes metabolitos se analizó mediante la prueba de t de dos colas; se evaluó si los tratamientos eran estadísticamente diferentes a los mostrados por el grupo placebo mediante un ANOVA del delta de los valores (valor final – valor basal).

2.2. Estudio en animales

2.2.1. Diseño

Estudio experimental que mediante dos experimentos evaluará si el bloqueo del receptor CB1 disminuye el efecto de la maca en:

1. Mejora de parámetros espermáticos.
2. Disminución del tiempo de fatiga.

2.2.2. Animales de experimentación

Para cada experimento se usarán 25 ratones macho (*Mus musculus*) de 3 meses de edad obtenidos del Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

2.2.3. Aclimatación

Una semana previa al inicio de los tratamientos, se aclimatará a los ratones en el Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Alimentación a base de purina especial balanceada y agua *ad libitum*.

2.2.4. Ética

El Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia aprobó el protocolo del proyecto con número de registro SIDISI 66587 (Anexo 2).

2.2.5. Tratamientos y Dosificación

El extracto acuoso de maca será administrado por vía oral (1.66 g/kg BW) diariamente.

Para todos los casos se evaluarán los efectos de AM251, un inhibidor específico del receptor cannabinoide CB1 (Sigma Aldrich Cod. A6226) que será administrado subdérmicamente. La concentración de AM251 que cada ratón recibirá será de 0.042 mg (Ballmaier *et al.*, 2007).

2.2.6. Preparación del extracto acuoso de maca

Se usarán hipocótilos secos de maca negra obtenidos del departamento de Junín e identificados como *Lepidium meyenii* Walp por Camilo Díaz, botánico de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los hipocótilos (500 gramos) serán pulverizados y puestos a ebullición en litro y medio de agua por 120 minutos aproximadamente siguiendo la metodología descrita por Chung *et al.*, 2005.

2.2.7. Preparación del AM251

AM251 (1 – (2,4 – diclorofenil) – 5 – (4 – iodofenil) – 4 – metil – N – 1 – piperidinil – 1H – pirazo – 3 – carboxamida, Sigma Aldrich Código A6226) se disolverá en etanol, Tween 80 y 0,9% de salino en proporción 1:1:18.

La solución stock se preparará el primer día de tratamiento y se almacenará a -20°C. Cada día de tratamiento se descongelará para ser administrada.

2.2.8. Grupos según tratamiento

Para cada experimento se tendrán los siguientes grupos:

1. Vehículo maca: agua destilada (Blanco).
2. Vehículo AM251: Tween 80, salino y etanol sub dérmico (Blanco).
3. Maca negra.
4. Maca negra y AM251 sub dérmico.
5. AM251 sub dérmico.

En la figura 2 se muestra el diagrama de flujo del experimento en animales.

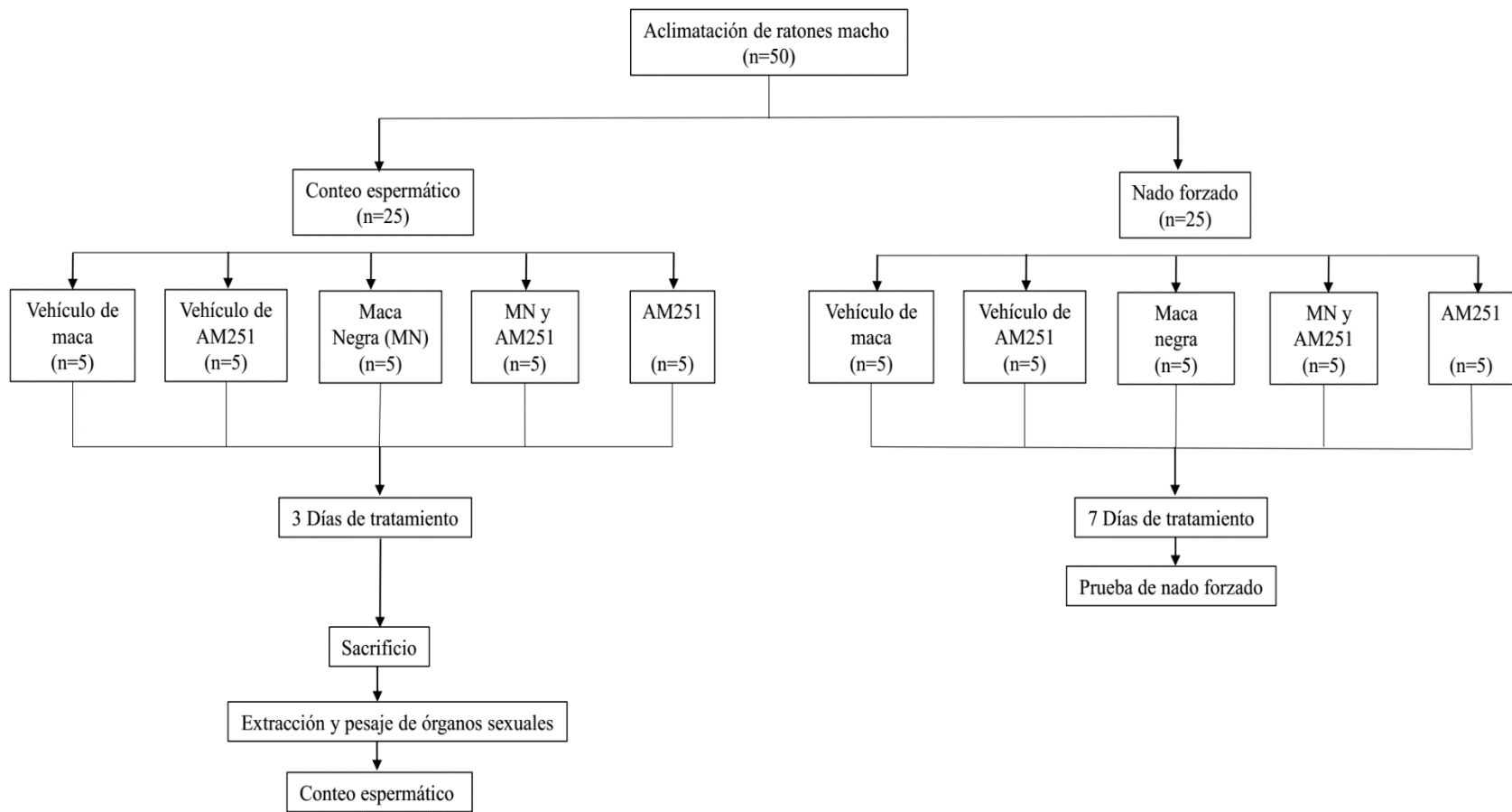


Figura 2. Diagrama de flujo del estudio en animales.

2.2.9. Evaluación de parámetros espermáticos

El tratamiento duró 3 días posteriormente los animales fueron sacrificados. Una vez muerto el animal, se hizo una incisión en la piel y se extrajo el testículo derecho con todo el epidídimo, luego se separó el testículo izquierdo con el conducto deferente intacto, éste se extrae completo a nivel de las vesículas seminales. Se extrajeron también las vesículas seminales y el testículo.

Los órganos extraídos fueron pesados y homogenizados en 1 mL de Triton (al 5 % en suero fisiológico) luego se colocaron en placas de plástico con suero fisiológico, se extrajo el conducto deferente a nivel del epidídimo izquierdo y fue puesto en una placa de plástico con 1 mL de suero fisiológico, se cortó el conducto deferente en trozos y se añadió 1 ml de solución de eosina al 0.2% diluida en suero fisiológico.

Posteriormente se colocó la muestra en la cámara de Neubauer donde se hizo el conteo espermático respectivo.

2.2.10. Prueba de nado forzado

El tratamiento duró 7 días. El AM251 o su vehículo fueron administrados cada 3 días, es decir, los días 1, 4 y 7 de tratamiento.

Un día después de finalizado el tratamiento, se realizó la prueba de nado forzado que consiste en atar a la cola del animal, un trozo de plomo que pese una décima parte del peso total del ratón, posteriormente los ratones fueron depositados en un recipiente con agua y se contabilizó el tiempo que tardaron hasta llegar a la inmovilidad. Se contabilizó 10 segundos de inmovilidad y se sacó a los ratones del agua.

Este procedimiento se realizó a condiciones de laboratorio, temperatura promedio del agua: 22° C.

2.2.11. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico STATA (versión 12.0). Para analizar los efectos de cada tratamiento se realizó una prueba de ANOVA de una vía y el análisis *post hoc* de Scheffe. Se consideró estadísticamente significativo un $p < 0.05$.

3. Capítulo III: Resultados

3.1. Estudios en humanos

3.1.1. Relación de los endocannabinoides y ácidos grasos en plasma de hombres y mujeres de Lima y Puno medidos por metabolómica

Se evalúan los endocannabinoides PEA, OEA, LEA y SEA. Los ácidos grasos precursores de endocannabinoides estudiados participan en la vía sintética de los endocannabinoides y son en su mayoría ácidos grasos mono y di hidroxilados (Ver tabla 3).

En la tabla 4 se muestran los principales endocannabinoides medidos en plasma y su relación con ácidos grasos precursores. PEA, OEA y LEA son los que mayormente correlacionan con los ácidos grasos precursores en tanto que SEA lo hace en menor proporción. Las correlaciones significativas son todas de relación lineal directa.

3.1.2. Relación de endocannabinoides con variables fisiológicas

Se analizó la relación entre los endocannabinoides y variables biológicas asociadas a hipoxia de altura y adaptación y falta de adaptación a la altura (Figuras 3-6).

La concentración de hemoglobina, el porcentaje de hematocrito y la presión arterial sistólica guardan una relación directamente proporcional de significancia estadística con la totalidad de endocannabinoides estudiados mientras que el porcentaje de saturación de oxígeno del pulso (SpO₂) es inversamente proporcional al nivel de eCBs, dicha relación es también estadísticamente significativa.

Dado que estas variables son importantes y se ven alteradas en condiciones de hipoxia por exposición a grandes altitudes (León Velarde & Monge, 1998), se ha estudiado estas mismas relaciones en las diferentes poblaciones estudiadas, resultados que se resumen en la Tabla 5.

Se aprecia que el efecto de la concentración de endocannabinoides varía a diferentes altitudes. A nivel del mar, ningún endocannabinoide tiene una relación con las variables biológicas estudiadas. Sin embargo, en altura niveles elevados de PEA y OEA están significativamente relacionados a un aumento de la concentración de hemoglobina y el porcentaje de hematocrito, mientras que todos los endocannabinoides están positiva y significativamente relacionados a un aumento en la presión arterial sistólica.

Tabla 4. Relación de endocannabinoides con metabolitos precursores.

<i>Metabolitos</i>	<i>PEA</i>	<i>OEA</i>	<i>LEA</i>	<i>SEA</i>	<i>AG</i>	<i>DHG</i>	<i>LLGb</i>	<i>OEAG</i>	<i>PAG</i>	<i>HODE</i>	<i>Hpalm</i>	<i>Hester</i>	<i>GliPE</i>
<i>OEA</i>	0.9a												
<i>LEA</i>	0.7a	0.7a											
<i>SEA</i>	0.8a	0.7a	0.69a										
<i>AG</i>	0	0.1	0.05	-0.1									
<i>DHG</i>	0.3	0.3	0.42b	0.29	0.34								
<i>LLGb</i>	0.3	0.3	0.5a	0.26	0.5	0.71a							
<i>OEAG</i>	0.5a	0.5a	0.58a	0.37d	0.36d	0.6a	0.75a						
<i>PAG</i>	0.5a	0.4d	0.5a	0.41c	0.38d	0.51a	0.64a	0.84a					
<i>HODE</i>	0.7a	0.5a	0.78a	0.66a	0.1	0.31	0.44b	0.62a	0.63a				
<i>Hpalm</i>	0.5a	0.5a	0.41c	0.34	0.28	0.34	0.29	0.52a	0.47a	0.47a			
<i>Hester</i>	0.4b	0.5a	0.36d	0.25	0.35	0.23	0.26	0.45a	0.46a	0.46a	0.86a		
<i>GliPE</i>	0.5a	0.3	0.27	0.54a	0.03	0.05	-0.06	0.05	0.13	0.37d	0.21	0.22	
<i>PE</i>	0.1	0	-0.2	0.02	-0.1	-0.3	-0.4b	-0.41	-0.38d	-0.4	-0.2	-0.2	0.5a

Se muestran los coeficientes de correlación de Pearson con corrección de Bonferroni. Estadísticamente significativos para a: $p < 0.001$, b: $p < 0.005$, c: $p < 0.01$, d: $p < 0.05$

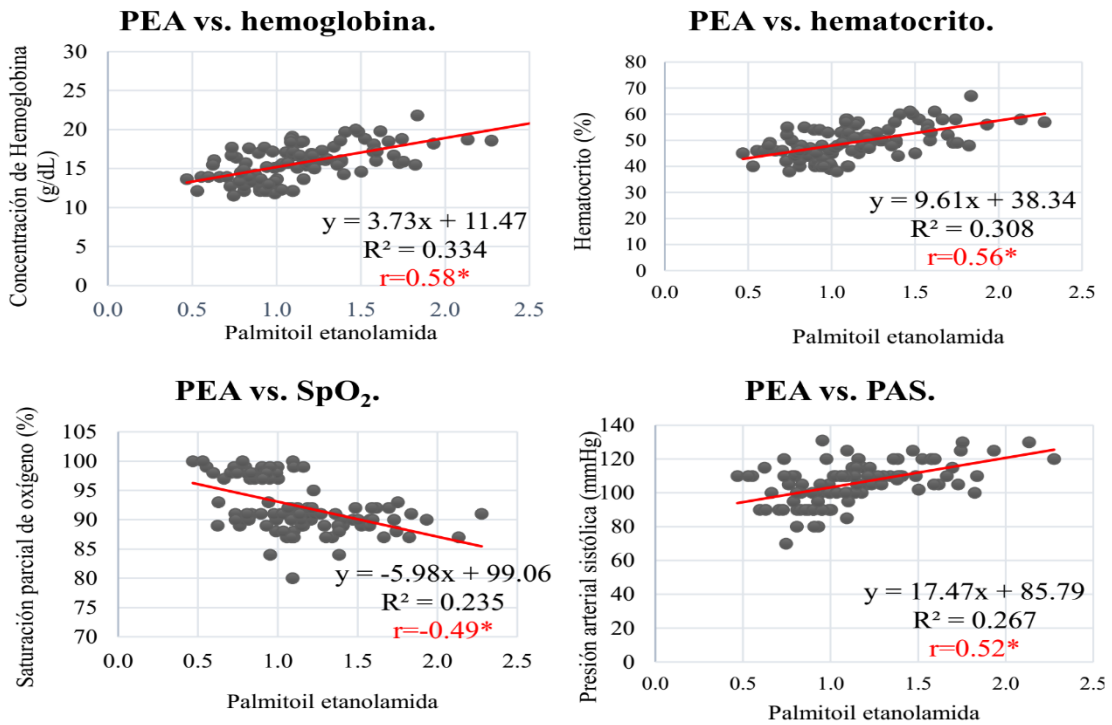


Figura 3. Relación de PEA con variables biológicas. Relación significativa para todas las variables * $p < 0.0001$, directamente proporcional para hemoglobina, hematocrito y presión arterial sistólica, inversa para saturación parcial de oxígeno.

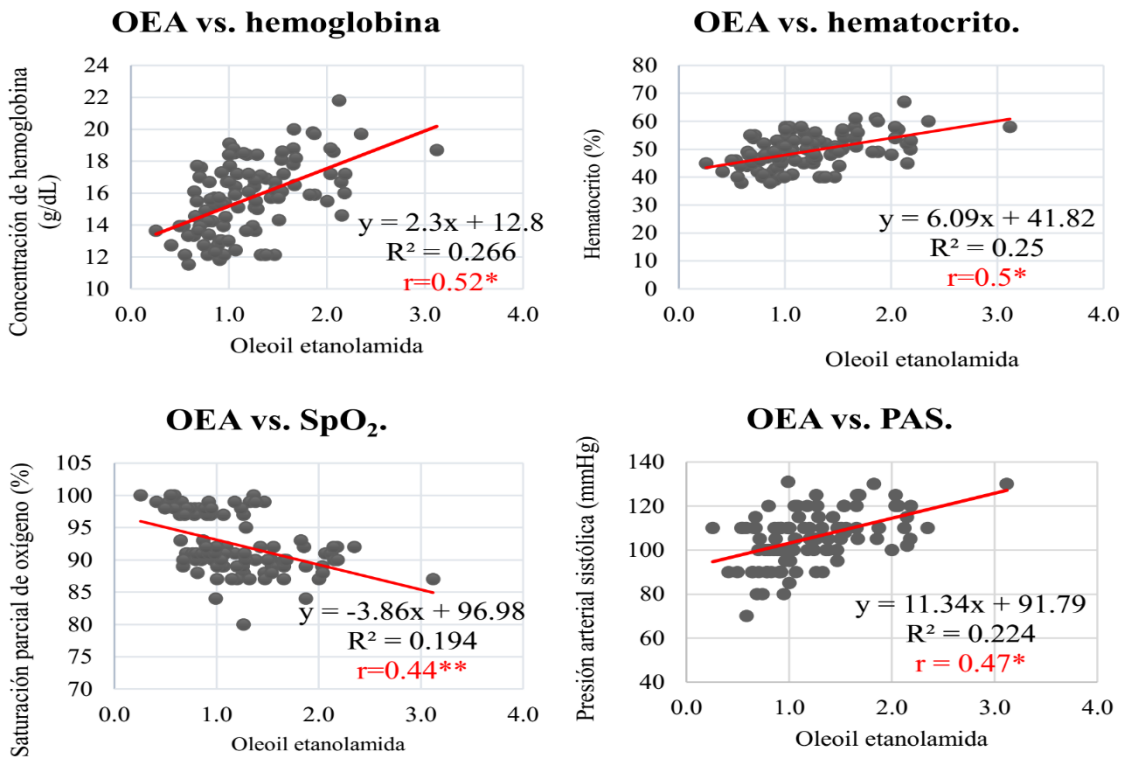


Figura 4. Relación de OEA con variables biológicas. Se muestra coeficiente de determinación R^2 y correlación r . Significativa para * $p < 0.0001$, ** $p = 0.001$. Lineal directa para hemoglobina, hematocrito, y presión arterial; lineal inversa para saturación de oxígeno.

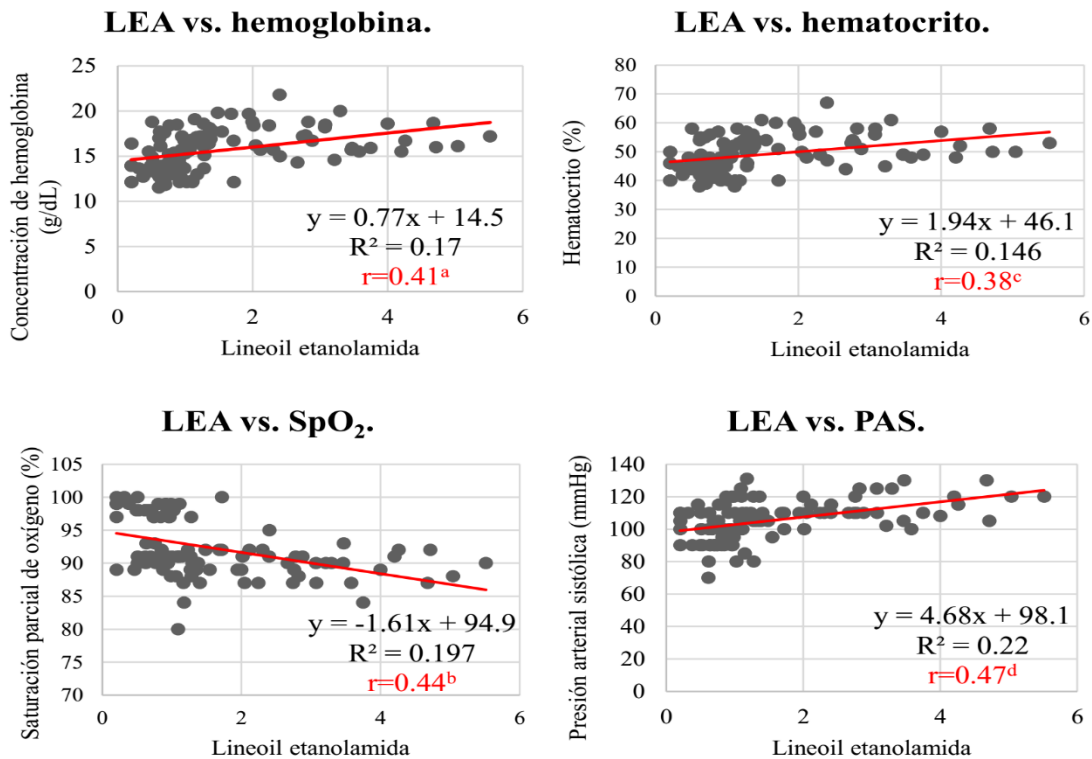


Figura 5. Relación de LEA con variables biológicas. Relación significativa para todas las variables. Directamente proporcional para hemoglobina (^ap=0.0005), hematocrito (^cp=0.0019) y presión arterial sistólica (^bp=0.0001), inversa para saturación parcial de oxígeno (*p<0.0001).

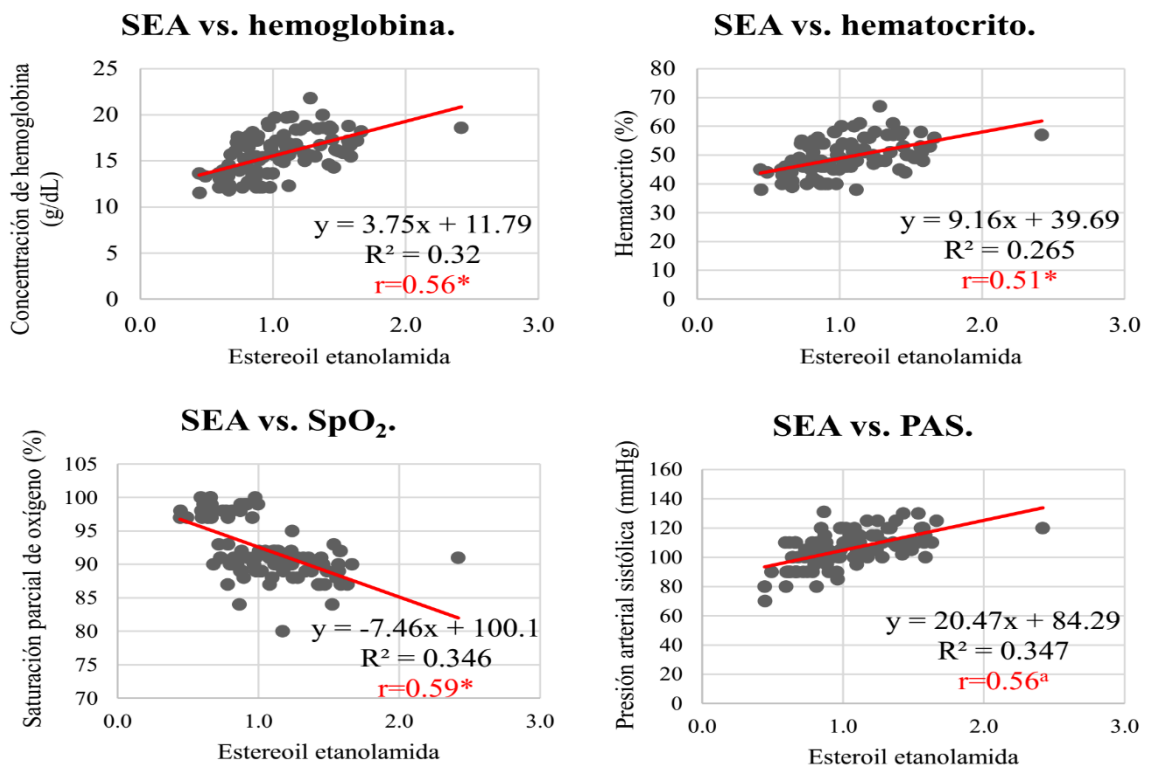


Figura 6. Relación de SEA con variables biológicas. Relación significativa para todas las variables (*p<0.0001, ^ap=0.0120). Relación lineal directa para hemoglobina, hematocrito y presión arterial sistólica; lineal inversa para saturación parcial de oxígeno.

Tabla 5. Relación entre variables fisiológicas y endocannabinoides a diferente altitud.

	PEA				OEA				LEA				SEA			
	Lima		Puno		Lima		Puno		Lima		Puno		Lima		Puno	
Hemoglobina	0.373	0.09	0.41	0.0006	-0.287	0.123	0.384	0.001	-0.312	0.48	0.131	0.28	-0.047	0.8	0.203	0.0918
Hematocrito	-0.307	0.098	0.39	0.0008	-0.288	0.12	0.382	0.0011	-0.131	0.489	0.116	0.34	-0.047	0.80	0.208	0.083
SpO₂	-0.198	0.4	-0.0396	0.74	-0.078	0.68	-0.11	0.363	-0.121	0.521	-0.07	0.54	0.242	0.19	-0.12	0.32
PAS	-0.09	0.624	0.432	0.002	0.036	0.849	0.389	0.0009	-0.134	0.477	0.37	0.001	0.36	0.90	0.392	0.0008

Se muestran coeficientes de correlación y valor de p. PEA y OEA tienen una relación lineal directa y positiva con hemoglobina y hematocrito solo en Puno. Todos los endocannabinoides correlacionan positiva y significativamente con presión arterial sistólica solo en Puno. No hay relación significativa de ningún endocannabinoide con saturación parcial de oxígeno en Lima ni en Puno.

3.1.3. Patrones basales de endocannabinoides y metabolitos asociados a nivel del mar y en la altura

El análisis de los datos de metabolómica en plasma de varones y mujeres adultas muestra que la población de altura tiene un patrón característico diferente al poblador de nivel del mar en relación a los endocannabinoides y ácidos grasos precursores de eCB.

Los cuatro endocannabinoides analizados en plasma son significativamente mayores en concentración en los nativos de Puno (Tabla 6).

Tabla 6. Valores basales de metabolitos según procedencia.

<i>Metabolito</i>	<i>Lima</i>	<i>Puno</i>	<i>p</i>
<i>PEA</i>	0.8438±0.1688	1.2509±0.3495	<0.001*
<i>OEA</i>	0.8658±0.3110	1.3570±0.5031	<0.001*
<i>LEA</i>	0.7181±0.3212	1.9493±1.2738	<0.001*
<i>SEA</i>	0.7060±0.1499	1.1784±0.3116	<0.001*

*Valores son medias ± error estándar de la media. *Prueba de t.*

3.1.4. Endocannabinoides y metabolitos relacionados a la inflamación

Se usaron los niveles de ácido araquidónico y eicosanoides, precursores de prostaglandinas y tromboxanos como marcadores inflamatorios. La señalización de eicosanoides y endocannabinoides está muy relacionada y es motivo de posterior discusión. La tabla 7 muestra la relación de endocannabinoides y eicosanoides en la población general, en Lima y en Puno, mientras que la tabla 8 muestra la diferencia de eicosanoides según procedencia. HEPE y ETE son más altos en la altura, en tanto que LB4 es más alto a nivel del mar.

Se observa una correlación lineal positiva entre eCBs y HEPE, HETE y AA plasmático en la población general. Esta correlación estadísticamente significativa se debe al aporte de la población de altura, dado que en la población a nivel del mar, no se aprecia relación significativa.

El caso del leucotrieno B4 (LB4) es especial pues en la población general y a nivel del mar no parece estar relacionado con ningún endocannabinoide, sin embargo en Puno la relación no sólo es positiva sino también significativa.

Tabla 7. Relación de eCBs y eicosanoides en la población general y por departamento.

<i>Metabolito</i>	<i>Lugar</i>	<i>PEA</i>	<i>OEA</i>	<i>LEA</i>	<i>SEA</i>	<i>AA</i>	<i>HEPE</i>	<i>HETE</i>
LB4	G	0.1233	0.0814	0.194	0.0378	0.4754*	0.3489**	0.5837*
	L	0.2749	0.0914	0.2812	-0.0529	0.3959	0.7297^a	0.8895*
	P	0.4724^d	0.3897^e	0.5697*	0.5260*	0.6372^a	0.5960*	0.7918*
HETE	G	0.5877*	0.4881*	0.6977*	0.5654*	0.7846*	0.8799*	
	L	0.4262	0.2628	0.4351	0.1153	0.6905^b	0.7822*	
	P	0.6039*	0.4896^g	0.7228*	0.6323*	0.8115*	0.8890*	
HEPE	G	0.5705*	0.4824*	0.6556*	0.5381*	0.6625*		
	L	0.1704	-0.0399	0.2146	0.0123	0.5354		
	P	0.5552*	0.4669^h	0.6390*	0.5321^a	0.7086*		
AA	G	0.6336*	0.4658*	0.5274*	0.5290*			
	L	0.6340^c	0.4774	0.4592	0.3814			
	P	0.7624*	0.5333^a	0.6181*	0.7183*			

*G: población total. L: Lima. P: Puno. Coeficiente de Pearson * $p < 0.0001$ ** $p = 0.0105$ ^a $p = 0.0001$
^b $p = 0.0007$ ^c $p = 0.047$ ^d $p = 0.001$ ^e $p = 0.0239$ ^g $p = 0.0005$ ^h $p = 0.0013$*

Tabla 8. Valores diferenciales de eicosanoides a diferente altitud.

<i>Metabolito</i>	<i>Lima</i>	<i>Puno</i>	<i>p</i>
<i>AA</i>	1.124±0.059	1.112±0.072	0.92
<i>HEPE</i>	1.369±0.139	3.047±0.421	0.0114*
<i>HETE</i>	1.722±0.024	2.759±0.363	0.037**
<i>LB4</i>	3.189±0.441	1.885±0.168	0.001*

*Prueba de t. *dos colas **1 cola.*

3.1.5. Efecto de los distintos tratamientos sobre los niveles de endocannabinoides

En la tabla 9 se muestra la variación de los endocannabinoides tras tres meses de tratamiento con placebo, maca roja o maca negra en nativos adultos de Lima y de Puno.

Tanto los niveles plasmáticos de PEA como de OEA disminuyen significativamente tras los tratamientos con maca, mientras que los valores no se modifican en los sujetos tratados con placebo. Los niveles de LEA disminuyen en los tres tratamientos con mayor significancia en aquellos donde está involucrada la maca.

El ácido araquidónico (AA) aumenta en el grupo tratado con el placebo, mientras en los grupos que tienen maca se denota una disminución que sólo es significativa en el caso de la maca negra.

Se muestra efecto placebo al analizar los resultados del ANOVA del delta de los valores finales y basales de eCBs, sólo la maca roja disminuye significativamente PEA respecto al placebo, mientras que sólo maca negra disminuye significativamente AA respecto a placebo. El efecto placebo es común en los tratamientos con plantas medicinales, especialmente en altura y es discutido en la sección correspondiente

Tabla 9. Valores basales y finales de metabolitos según tratamiento.

<i>Metabolito</i>	<i>Placebo</i>			<i>Maca Roja</i>			<i>Maca Negra</i>		
	Basal	Final	p	Basal	Final	p	Basal	Final	p
<i>PEA*</i>	1.022±0.059	0.987±0.0421	0.519	1.216±0.0575	1.027±0.0351	0.0015	1.140±0.0666	0.993±0.0442	0.012
<i>OEA</i>	1.0366±0.0829	0.9202±0.062	0.16	1.299±0.7231	1.0369±0.054	0.001	1.2901±0.503	1.0283±0.076	0.007
<i>LEA</i>	1.275±0.1723	0.845±0.738	0.007	1.711±0.204	1.1031±0.077	0.003	1.754±0.250	0.9332±0.096	0.0004
<i>SEA</i>	0.969±0.0526	0.9762±0.048	0.89	1.100±0.063	1.0365±0.050	0.2	1.033±0.062	1.008±0.0463	0.63
<i>AA**</i>	0.930±0.0655	1.0022±0.075	0.28	1.198±0.101	1.105±0.0627	0.306	1.217±0.096	1.032±0.0691	0.03

*Valores son medias ± Error estándar. Delta de PEA y AA significativo entre tratamientos *p=0.0498 maca roja vs placebo. ** maca negra vs placebo.*

3.2. Estudios en animales

3.2.1. Pesos corporales y de órganos reproductivos

AM251 es un fármaco con potentes efectos anorexigénicos, es decir, disminuye el apetito. Se pesaron los animales antes y después de los tratamientos que duró tres días para el conteo espermático (Fig. 7 A) y siete días para el nado forzado (Fig. 7 B). No se observó variación significativa en el peso de los ratones en ningún tratamiento.

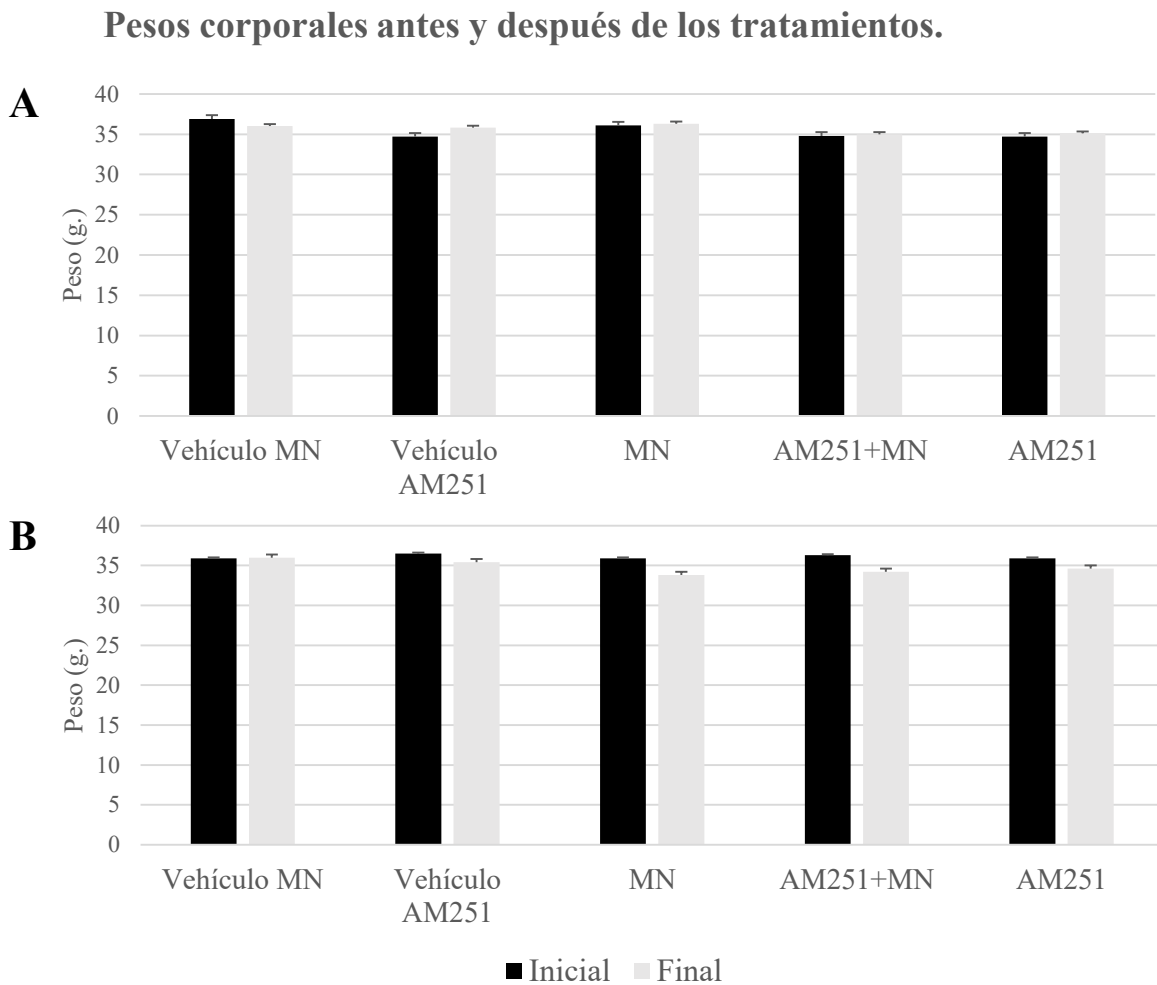


Figura 7. Pesos corporales de animales de experimentación. Pesos promedio de los ratones del experimento de conteo espermático (A) y nado forzado (B) antes y después de cada tratamiento. Ningún tratamiento alteró significativamente el peso inicial ($p>0.05$).

Los órganos reproductivos fueron pesados una vez finalizados los tratamientos (Fig. 8)

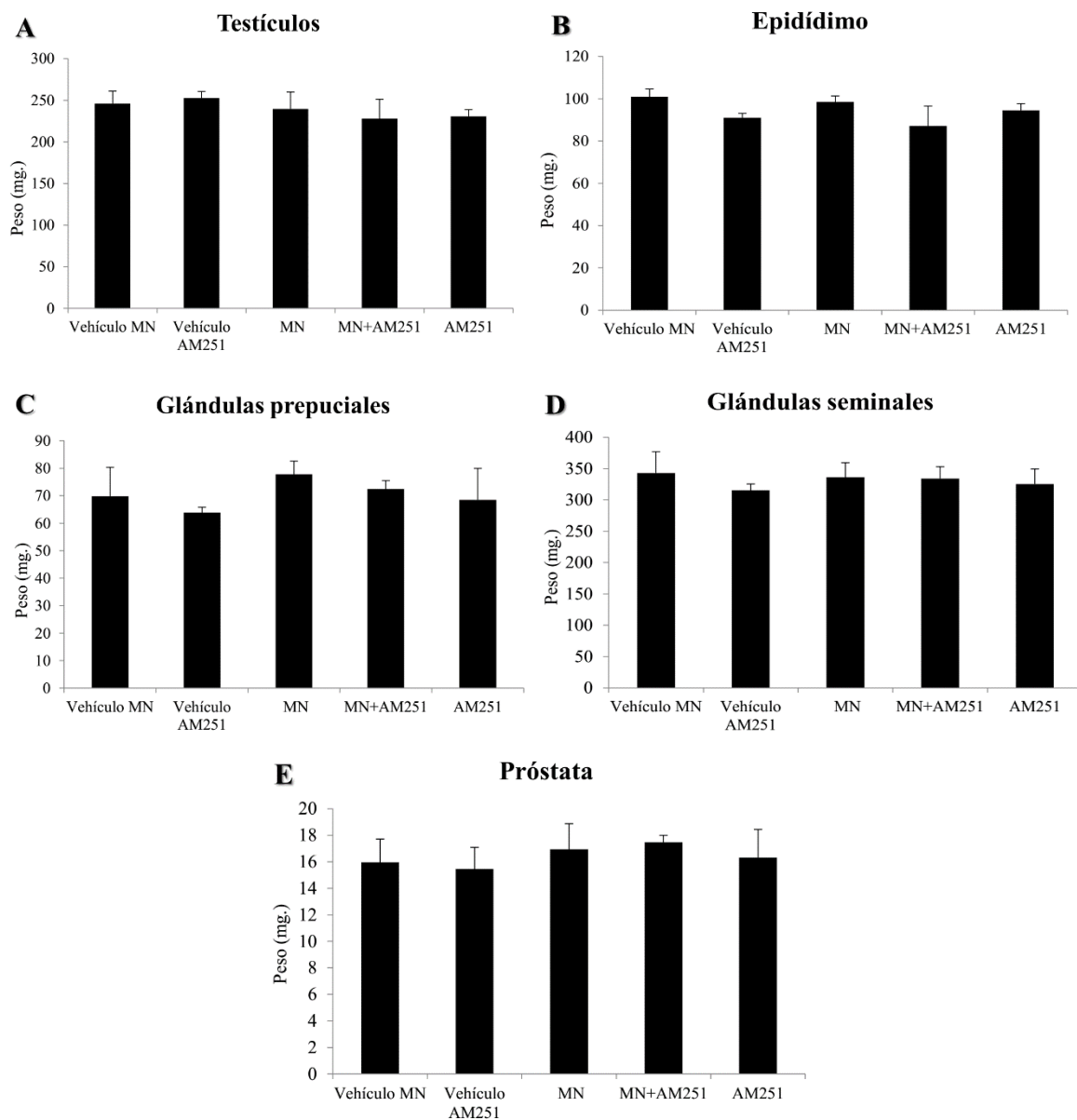


Figura 8. Peso de órganos reproductivos según tratamiento. Ningún tratamiento tuvo efectos en los pesos de los testículos (A), glándulas seminales (D) ni próstata (E) órganos importantes en el proceso de espermatogénesis, ni en el epidídimo (B) y glándulas prepuciales (C) órganos accesorios ($p > 0.05$).

Ni los testículos (Fig. 8 A) ni la próstata (Fig. 8 E), ni las glándulas seminales (Fig. 8 D), órganos vitales en la producción de espermatozoides, variaron significativamente entre tratamiento ($p > 0.05$), de similar manera, el epidídimo, estructura donde el espermatozoide madura y se transporta tampoco varió entre tratamientos ($p > 0.01$). Ningún tratamiento produjo una variación significativa ($p > 0.05$) en las glándulas prepucales consideradas glándulas accesorias. De haber habido variación se evidenciaría que alguno de los tratamientos fue tóxico para el animal pues evidenciaría procesos apoptóticos o proliferativos anormales que no están relacionados al proceso de espermatogénesis (Gupta, 2012).

3.2.2. Bloqueo de CB1 sobre la respuesta biológica a la maca negra

3.2.2.1. AM251 inhibe efectos positivos de la maca sobre parámetros espermáticos

La administración de extracto acuoso de maca negra resulta en un incremento de la producción o conteo diario de espermatozoides (CDE), conteo de espermatozoides en epidídimo y en conducto deferente en ratones tratados durante tres días. Este efecto es antagonizado por la administración de AM251 un bloqueador selectivo del receptor CB1 (Fig. 9).

Para el conteo espermático del testículo se realizó el test ANOVA para evaluar si el número de espermatozoides es diferente entre los diferentes tratamientos $F(4,95)=40.55$ $p<0.0001$. El análisis *post hoc* de Scheffé revela que el tratamiento de maca negra aumenta significativamente el conteo espermático respecto al grupo control ($p<0.0001$) y que el bloquear el receptor CB1 con AM251 disminuye los efectos de la maca negra sobre este parámetro ($p<0.0001$). El solo bloqueo del receptor no produjo una disminución significativa respecto al grupo control ($p=0.711$) pero si respecto al tratamiento con maca ($p<0.0001$) e incluso respecto al tratamiento de maca con AM251 ($p=0.0001$)

Hay diferencias significativas en el conteo espermático de los distintos tratamientos en el conducto deferente ($F=20.17$, $P<0.0001$). La maca negra aumenta el número de espermatozoides en el conducto deferente respecto al control ($p<0.0001$) y AM251 también inhibe este efecto ($p<0.0001$ respecto a grupo control y grupo con sólo maca). Similar resultado se da en el conteo espermático del epidídimo total (cabeza y cola) ($F(4, 195)=16.66$, $P<0.0001$). AM251 vs Maca+AM251 $p<0.0001$.

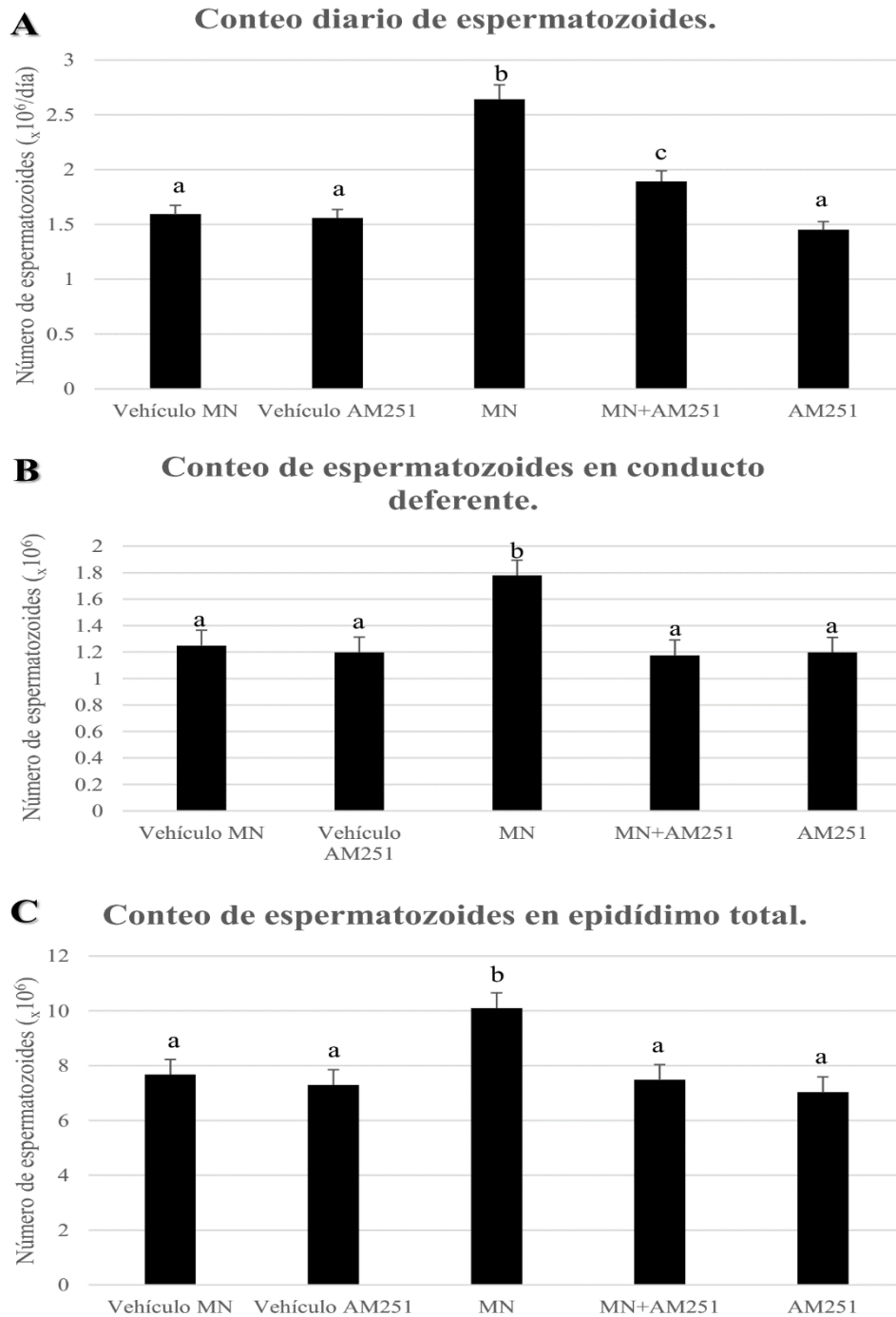


Figura 9. Producción diaria y conteo de espermatozoides según tratamiento. (A) Producción diaria de espermatozoides en testículo. Conteo espermático en (B) conducto deferente y (C) epidídimo total. Letras diferentes denotan diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.0001$). El tratamiento con maca negra (MN) aumenta todos los parámetros, efecto inhibido por AM251. El tratamiento con AM251 no produjo diferencias respecto a su vehículo ($p > 0.05$).

3.2.2.2. El efecto en el retardo en el tiempo de fatiga de la maca negra depende del receptor CB1

El extracto acuoso hervido de maca negra incrementa el tiempo de movimiento en la prueba de nado forzado ($p < 0.0001$ respecto al vehículo), pero al bloquear el receptor cannabinoide, este efecto desaparece ($p = 0.006$ respecto a grupo con maca negra). El solo bloqueo del receptor no reduce el tiempo de movimiento total ($p = 0.993$ respecto al vehículo de AM251) (Fig. 10).

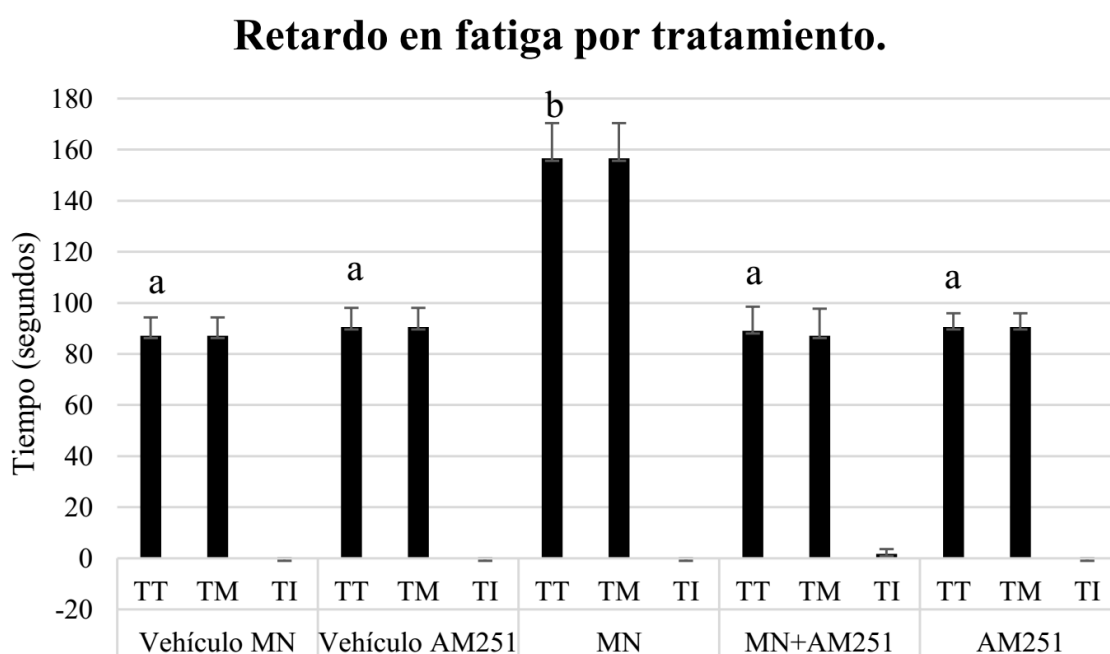


Figura. 10. Efecto de los distintos tratamientos sobre el retardo en fatiga medida mediante prueba de nado forzado. TT: tiempo total, TM: tiempo en movimiento, TI: tiempo de inmovilización. La maca negra tiene efecto energizante al retardar la fatiga respecto al vehículo ($p < 0.001$). Bloquear el receptor CB1 usando AM251 inhibe este efecto ($p = 0.006$). Letras distintas denotan diferencia significativa ($p < 0.0001$).

3.3. Discusión

3.3.1. Estudios en humanos

3.3.1.1. Rol de los endocannabinoides en la fisiopatología del mal de montaña crónico

El efecto de los endocannabinoides sobre las variables fisiológicas es notable, especialmente porque las variables estudiadas tienen importancia en la biología de altura y en el desencadenamiento del mal de montaña crónico (MMC), especialmente por la aumentada concentración de hemoglobina y la reducción en la saturación arterial de oxígeno que se observa en los nativos de altura como respuesta a la hipoventilación causada por la presión parcial de oxígeno disminuida que predomina en alturas mayores a 2000 m.s.n.m y que causa una desaturación de la sangre arterial y la sintomatología que caracteriza a esta patología (León Velarde & Monge, 1998).

La adaptación de un organismo a un medio cambiado implica mantener una homeostasis y características fenotípicas que le permitan afrontar sin dificultad la vida en un ambiente cambiado.

Los endocannabinoides regulan la homeostasis de los órganos en los que se expresan sus receptores. Los sistemas que rigen a los organismos y son importantes en los procesos de adaptación y mantenimiento de la homeostasis son el sistema nervioso, el sistema inmunológico y el sistema endocrino. Numerosos estudios presentados en los últimos años muestran que el sistema endocannabinoide tiene un rol regulatorio en estos tres sistemas, por lo que consideramos pueda intervenir en los procesos de adaptación a la altura.

La anandamida aumenta la presión arterial pulmonar (Wahn *et al.*, 2005). La hipertensión pulmonar es un componente que se presenta en el mal de montaña crónico y se basa en la hipoxemia, presentando un comportamiento parabólico respecto a la saturación arterial de oxígeno que a su vez depende de la altura de residencia; es decir, a alturas mayores de 3500 msnm la presión arterial pulmonar empieza a incrementarse y este aumento está relacionado a la aparición de signos como hipoxemia y eritrocitosis excesiva (Peñaloza, 2012)

La hipertensión pulmonar aumenta a medida que cae la saturación arterial de oxígeno en nativos de altura con mal de montaña crónico (Peñaloza, 2012).

El incremento en los niveles de endocannabinoides en Puno mediaría la disminución en SpO₂ y con ello aumentaría la presión arterial pulmonar.

El aumento en la presión de la arteria pulmonar que se observa en la altura se da a través de metabolitos relacionados a la ciclooxigenasa 2, una citoquina inflamatoria importante en la vía de señalización de los eicosanoides proinflamatorios (Wahn, 2005).

En el experimento de Wahn (2005) el bloqueo del receptor CB1 no logra revertir este efecto pero un inhibidor específico de la hidrolasa de ácidos grasos amídicos es capaz de hacerlo.

Estos datos explicarían porque el puntaje de MMC es menor en nativos de altura que consumen regularmente maca (Gonzales *et al*, 2013).

Sin duda el parámetro más importante en la patología del MMC es la concentración elevada de hemoglobina y mayor porcentaje de hematocrito como indicador de eritrocitosis excesiva. El estudio se ha realizado en Puno, una población de mayor antigüedad generacional en la altura y por lo tanto con un número importante de pobladores adaptados.

Un sujeto adaptado a vivir en la altura es considerado aquel que vive adecuadamente con valores más bajos de Hb que aquellos no adaptados y que no llegan a tener valores de eritrocitosis excesiva. En efecto, sujetos con mayor hemoglobina tienen mayor grado de hipoxemia que aquellos viviendo en el mismo lugar tienen menos niveles de hemoglobina (Gonzales & Tapia, 2013).

La vida en las grandes alturas es una situación de estrés oxidativo (Jefferson *et al.*, 2004). El estrés oxidativo también explicaría los mayores niveles de eCBs en Puno en comparación a Lima. El sistema eCB es considerado un sistema de respuesta frente al estrés central y periférico (Strewe *et al.*, 2012). En un estudio, Strewe *et al.* (2012) muestran que cuando se viaja al espacio, los niveles plasmáticos de eCBs aumentan y cuando se regresa a la tierra retornan a los valores basales.

Es interesante entonces el hallazgo que en los pobladores de Puno los niveles de eCBs están incrementados, lo cual se debería a una respuesta al estrés ambiental. El que los niveles de eCBs estén más altos justamente en aquellos sujetos con mayores niveles de hemoglobina en

condiciones de hipoxia implica que un individuo adaptado a la altura sería aquel con valores de eCBs plasmáticos similares a los observados a nivel del mar.

Se conoce por la literatura científica que hay una relación entre la anandamida y los factores de crecimiento hematopoiético HGF. La anandamida potencia los efectos proliferativos de los HGFs y la proliferación de líneas celulares hematopoiéticas siempre y cuando actúe conjuntamente con IL3, G-CSF, M-CSF y Epo; especialmente IL3 (Valk *et al.*, 1997). Esto implicaría que los eCBs ante la presencia de moléculas pro-inflamatorias activa la eritropoyesis.

En condiciones de altura, los niveles de interleuquinas proinflamatorias están elevados pues la hipoxia induce una respuesta inflamatoria en células inmunes y endoteliales (Hartmann *et al.*, 2000) al igual que la secreción de eritropoyetina (Basu *et al.*, 2007) por lo que en altura, la anandamida estaría involucrada en la hematopoesis elevada.

A pesar de que en nuestros metabolitos no se analizó la anandamida *per se*, el que haya un significativo aumento en otros endocannabinoides y esté reportado un incremento en la señalización de este sistema en hipoxia (Feurecker *et al.*, 2012) sugiere que los niveles de AEA jugarían un rol en la hematopoyesis en condiciones de altura. Dado que se han identificado ambos receptores cannabinoides en células hematopoiéticas (Kaminski *et al.*, 1992) otros endocannabinoides podrían también contribuir.

También se ha reportado la presencia de receptores cannabinoides, especialmente CB2, en mastocitos que al unirse a un ligando agonista, controlan la activación de estas células y a su vez la inflamación. Se ha estudiado los efectos de PEA sobre este receptor cannabinoide periférico y se encontró que actuaba como un potente agonista, por ende promovería la liberación del contenido intracelular de los mastocitos, histamina y citoquinas inflamatorias (Facci *et al.*, 1995).

Los mastocitos cumplen un rol importante en la modulación de la eritropoyesis en circunstancias especiales como la inflamación (Klimenko & Tatarko 1995) y nuestros resultados apuntan a que en hipoxia este efecto se vería exacerbado explicando la mayor proliferación de células hematopoiéticas que finalmente darían lugar a la eritrocitosis excesiva (Fig. 11).

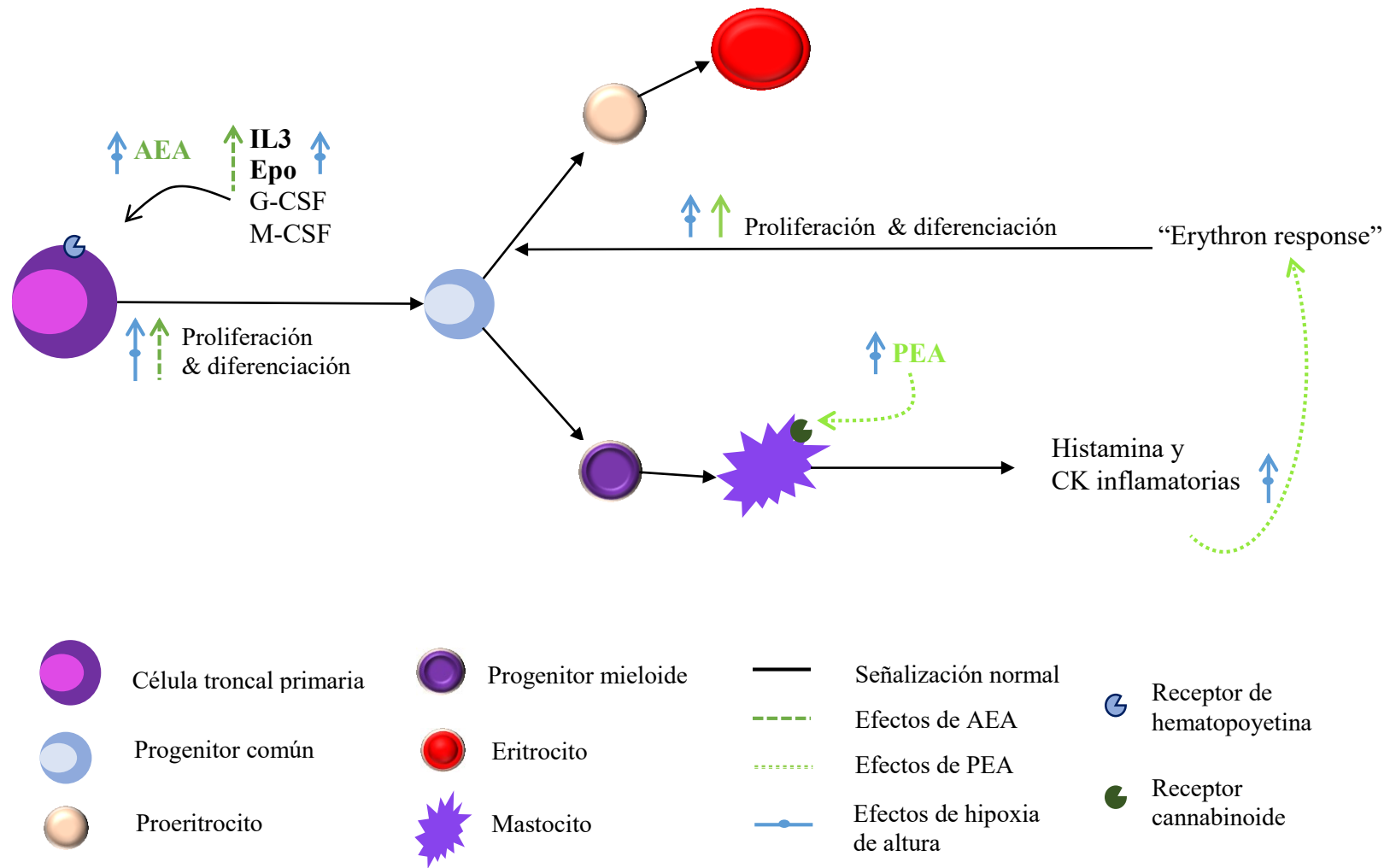


Figura 11. Esquema del efecto de los endocannabinoides y la altura en la producción de eritrocitos y mastocitos. Factores de crecimiento hematopoyético disparan la proliferación y la diferenciación celular que finalmente dará lugar a células especializadas. En altura hay una elevación de EPO que exagera el proceso normal, al igual que AEA y PEA que en condiciones de inflamación son capaces de influir sobre la producción de eritrocitos mediante la erythron response proceso especial donde los mastocitos pueden influir positivamente en la eritrocitosis.

3.3.1.2. Presión arterial y endocannabinoides

Se ha comprobado reiteradamente el efecto hipotensor de la anandamida (Varga *et al.*, 1996; del Carmen *et al.*, 2003), a tal punto de haber sido clínicamente probados y con gran éxito inhibidores específicos de FAAH en sujetos con hipertensión arterial, demostrando una vez más los nexos entre los efectos de *L. meyenii* y este sistema ya que el consumo de maca disminuye la presión arterial (Gonzales *et al.*, 2014). Nuestros resultados que muestran una relación positiva entre eCBs y presión arterial son llamativos especialmente porque disgregando esta relación en las diferentes poblaciones estudiadas se percibe que es en Puno donde reside la significancia de esta relación. No está muy clara la relación de la altura con la presión arterial. Una exposición aguda aumenta la presión arterial que se mantiene durante las primeras semanas; sin embargo la gran variabilidad interindividual de este parámetro especialmente en personas sanas no ha permitido relacionarla con los cambios fisiológicos de climatización y adaptación a altura (Bärtsch & Gibbs, 2007).

3.3.1.3. Endocannabinoides e inflamación

La señalización de los endocannabinoides y eicosanoides tienen un eslabón que las une: como precursor común ácido araquidónico; las rutas sintéticas que resultan en su producción no comparten las mismas enzimas pero responden de similar manera a segundos mensajeros como una elevación en el contenido de calcio intracelular (Rouzer & Marnett, 2011) por lo que se ha sugerido su activación paralela.

En la tabla 7 se mostró cómo los eCBs estaban relacionados positivamente a los eicosanoides especialmente en la población de altura, estos datos sugieren que en determinadas condiciones podrían activarse conjuntamente estas vías.

3.3.2. Estudios en animales

3.3.2.1. AM251 no tiene efectos en el peso de animales estudiados

La activación del receptor CB1 por ligandos endógenos como por exógenos tiene efectos orexigénicos ampliamente documentados (Williams, 1999; Kirkham, 2002) y AM251 es un antagonista usado sólo en pruebas experimentales pero que guarda una similitud estructural importante con Rimonabant, un fármaco que tuvo por público objetivo personas con obesidad pero que fue sacado del mercado por producir efectos deletéreos sobre el estado anímico. (Kang, 2012)

Por lo que no ver una reducción significativa en el peso de los ratones no es un resultado esperado. Es probable que la dosis no haya sido lo suficientemente alta o el tiempo de tratamiento muy corto.

3.3.2.2. Bloqueo farmacológico de CB1 inhibe efectos de maca sobre parámetros espermáticos

Al bloquear el receptor CB1, disminuye el número total de espermatozoides en testículo, epidídimo y conducto deferente en ratón (Fig. 9). Estos resultados son llamativos puesto que se sabe que al activarse el receptor CB1 por ligandos exógenos como THC, hay efectos adversos sobre la capacidad reproductiva masculina (Battista, 2015).

El rol que juega el receptor CB1 en la fertilidad masculina ha sido muy estudiado y ha sido motivo de mucho debate. Se sabe que un fumador usual de marihuana tiene serias afectaciones en su capacidad reproductiva, por ejemplo alteraciones hormonales y motilidad espermática deficiente por lo que se ha sugerido que el receptor CB1 al ser activado influiría negativamente en la reproducción (Battista, 2015). Sin embargo, mediciones del plasma seminal de sujetos con problemas reproductivos (astenoteratozoospermia, oligozoospermia y azoospermia) muestran que tienen niveles de AEA inferiores a hombres sin afectaciones de esa naturaleza (Amoako *et al.*, 2013). Si la activación de receptor CB1 no fuera compatible con la fertilización, no se explicarían estos resultados.

Al bloquear el receptor CB1 con AM251 la capacidad de la maca negra para incrementar el conteo espermático se ve significativamente inhibida. Nuestra hipótesis señala que *L. meyenii*

inhibe FAAH, lo que llevaría a un incremento de AEA circulante. Al bloquear el receptor CB1, la AEA no tendría receptor sobre el cual trabajar. La AEA y CB1 juegan un rol importante en los procesos de espermatogénesis y espermiogénesis.

En un estudio en ratones, Chioccarelli *et al.* (2010) demostró que la activación del receptor CB1 regula el remodelamiento de la cromatina y controla el empaquetamiento del ADN. Un *knock out* del gen que codifica CB1 reduce la calidad de la cromatina espermática y produce mayores tasas de fragmentación de DNA espermático, especialmente durante el tránsito del espermatozoide a través del epidídimo.

Por tanto, no es el receptor CB1 el incompatible con la salud reproductiva, sino un desbalance en su regulación; la presencia de sustancias exógenas como el THC altera la regulación cannabinoide porque compite con la AEA por el receptor, disminuyendo el “tono de AEA” necesario para el metabolismo de las células espermáticas y su normal proliferación y diferenciación.

La no variación del peso de órganos sexuales (Fig. 8) indica que ningún tratamiento permitió la proliferación celular irregular en los animales de experimentación.

3.3.2.3. El efecto energizante de *Lepidium meyenii* depende del receptor CB1

La resistencia al ejercicio físico es una variable multifactorial que involucra diversos sistemas, entre ellos el nervioso. Es en este sistema donde los eCBs ejercerían sus mayores efectos.

En el cerebro, la mayor densidad de receptores CB1 se encuentra en los ganglios basales, específicamente en los núcleos de salida y en el cerebelo (Dietrich & McDaniel, 2004). Los ganglios basales y el cerebelo son responsables del control motor voluntario (Jueptner *et al.*, 1998).

La inactivación del receptor CB1, ya sea farmacológica o genéticamente (KO del gen codificante) produce hipoactividad (Steiner *et al.*, 1999; Dietrich & McDaniel, 2004) Resultado concordante con el obtenido al bloquearlo con AM251 (Fig. 10).

La maca posee un efecto energizante (Fig. 10) pero los mecanismos detrás no son conocidos. A luz de los resultados de bloqueo farmacológico, es posible aseverar que la capacidad

inhibitoria de FAAH que presenta la maca aumentaría el tiempo de circulación de la AEA manteniendo activados por más tiempo los receptores CB1 y logrando así mayor movimiento.

Otro factor importante en la resistencia física es el consumo de oxígeno. Braga (2016) ha reportado que el consumo de maca aumenta el consumo máximo de oxígeno (VO₂ max). Los receptores cannabinoideos activan las vías del óxido nítrico (Stefano *et al.*, 2000) que inhiben la citocromo c oxidasa promoviendo un mejor uso el oxígeno (Brown & Borutaite, 2001), una economía de oxígeno más eficiente.

Estos mecanismos no han sido estudiados a profundidad y representan un fértil campo de investigación a futuro.

3.3.2.4. Posible mecanismo de acción de *Lepidium meyenii*

Se ha demostrado mediante el ensayo de bloqueo farmacológico, que los efectos positivos de la maca no persisten una vez bloqueado el receptor CB1. Por tanto, las macamidas contenidas en *L. meyenii* son las grandes responsables de sus efectos positivos, por lo menos en los parámetros estudiados.

Al inhibir FAAH no sólo se aumenta y alarga el tiempo de acción de la anandamida, sino que también disminuye el pool de ácido araquidónico disponible para la posterior síntesis de eicosanoides proinflamatorios, lo cual explicaría el efecto antiinflamatorio que se ha reportado tiene la maca.

Sin embargo las macamidas no sólo regularían indirectamente este sistema mediante la inhibición de FAAH. Hajdu (2014) identificó ciertas macamidas capaces de unirse selectiva, aunque débilmente, al receptor CB1, mimetizando el accionar de la anandamida. De manera que directa e indirectamente, es a través de este sistema donde la maca ejerce sus efectos positivos sobre los distintos parámetros. Se mostró en la Tabla 1, que la cantidad de macamidas varía entre los diferentes fenotipos de maca por lo que es necesaria su identificación y análisis. La naturaleza de las macamidas podría explicar el efecto biológico diferencial de estas.

La figura 12 grafica esta hipótesis.

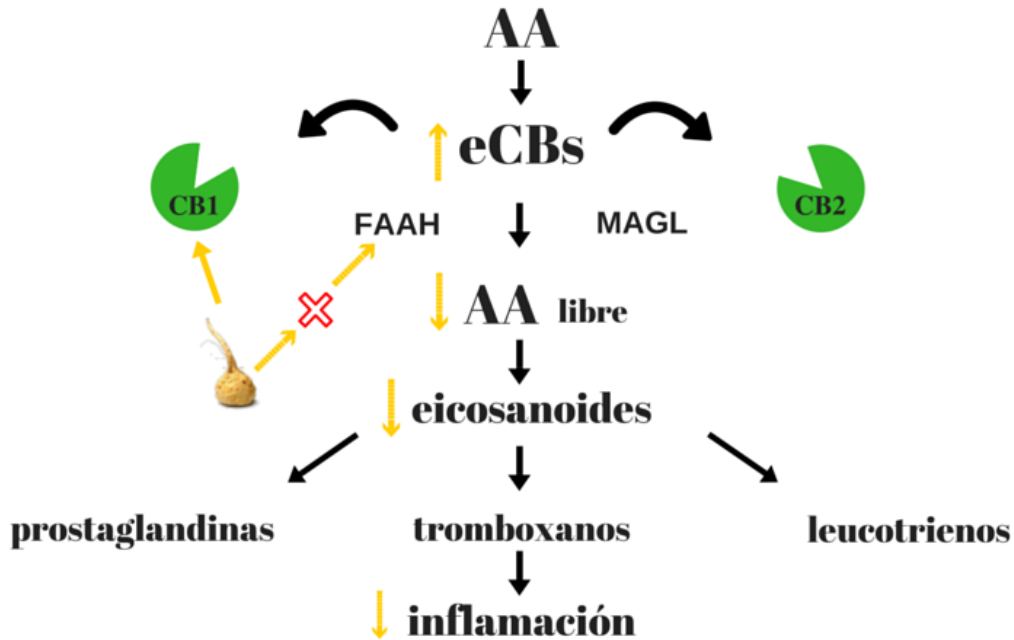


Figura 12. Posible mecanismo de acción de *Lepidium meyenii*. Las macamidas actúan indirectamente sobre el sistema endocannabinoide inhibiendo FAAH incrementando el nivel de eCBs circulantes y potenciando su acción sobre los receptores CB1 y CB2. El *pool* de ácido araquidónico libre para la síntesis de eicosanoides proinflamatorios disminuye lo cual explicaría el potencial antiinflamatorio de la maca. La maca también puede actuar directamente sobre este sistema pues algunas macamidas pueden unirse directa y selectivamente al receptor CB1.

4. Capítulo IV: Conclusiones

4.1 Humanos

- Los niveles de endocannabinoides están elevados en los nativos de altura en comparación con los habitantes del nivel del mar y dicha elevación guarda relación con la mayor concentración de hemoglobina y la menor saturación parcial de oxígeno sugiriendo un posible rol de los eCBs en la etiopatología del mal de montaña crónico.
- El consumo de maca durante tres meses reduce los niveles basales de los endocannabinoides palmiotil etanonalmida y oleoil etanolamida y de ácido araquidónico en los nativos de altura. PEA y OEA no son degradados por FAAH, de tal manera que la maca modularía el sistema endocannabinoide por más de un mecanismo

4.2. Animales

- La respuesta biológica de la maca negra sobre el conteo espermático se ve inhibida con el bloqueo del receptor cannabinoide 1 en ratones macho adultos.
- Los efectos de la maca como retardante de fatiga y energizante se ven inhibidos después de bloquear selectivamente el receptor cannabinoide 1 en un modelo animal usando ratones macho adultos.

4.3. Sugerencias

- Los endocannabinoides parecen jugar un rol central en la etiología del MMC, condición que está ligada a los procesos de adaptación a la altura. Se ha estudiado una población con mayor tiempo generacional viviendo en dichas condiciones, es necesario estudiar los mismos parámetros en personas expuestas de manera aguda a la hipoxia y/o poblaciones con menor tiempo generacional. En este escenario, Cerro de Pasco se perfila como la población experimental ideal para develar cómo están los patrones basales en una población generacionalmente menos adaptada. En la misma línea, sólo 10 sujetos estudiados en el presente trabajo presentaron un score de MMC mayor a 5, es necesario evaluar los niveles de eCBs en nativos de altura sanos vs. aquellos con diagnóstico de MMC.
- Es necesario rehacer los ensayos de bloqueo farmacológico tomando en consideración diferentes dosis de bloqueador para ver si el efecto es dosis dependiente.
- Para una mejor dilucidación del rol de las macamidas y el sistema endocannabinoide, los futuros ensayos de bloqueo farmacológico deben incluir la cuantificación e identificación de las mismas.

5. Referencias bibliográficas

1. Ahn K, McKinney MK, Cravatt BF. (2008) Enzymatic pathways that regulate endocannabinoid signaling in the nervous system. *Chem Rev.* 108(5):1687-707.
2. Alger BE. (2012) Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *J Physiol.* 590(10):2203-12.
3. Almukadi H, Wu H, Böhlke M, Kelley CJ, Maher TJ, Pino-Figueroa A. (2013) The macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide is a time-dependent fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor. *Mol Neurobiol.* 48(2):333-9.
4. Amoako AA, Marczylo TH, Elson J, Taylor AH, Willets JM, Konje JC. (2014) Relationship between seminal plasma levels of anandamide congeners palmitoylethanolamide and oleoylethanolamide and semen quality. *Fertil Steril.* 102(5):1260-7.
5. Ballmaier M, Bortolato M, Rizzetti C, Zoli M, Gessa G, Heinz A, Spano P. (2007) Cannabinoid receptor antagonists counteract sensorimotor gating deficits in the phencyclidine model of psychosis. *Neuropsychopharmacology.* 32(10):2098-107.
6. Baranowska-Kuczko M, Kozłowska H, Kloza M, Karpińska O, Toczek M, Harasim E, Kasacka I, Malinowska B. (2016) Protective role of cannabinoid CB1 receptors and vascular effects of chronic administration of FAAH inhibitor URB597 in DOCA-salt hypertensive rats. *Life Sci.* 151:288-99.
7. Bärtsch P, Gibbs JS. (2007) Effect of altitude on the heart and the lungs. *Circulation.* 6;116(19):2191-202.

8. Basu M, Malhotra AS, Pal K, Prasad R, Kumar R, Prasad BA, Sawhney RC. (2007) Erythropoietin levels in lowlanders and high-altitude natives at 3450 m. *Aviat Space Environ Med.* 78(10):963-7.
9. Battista N, Bari M, Maccarrone M. (2015) Endocannabinoids and Reproductive Events in Health and Disease. *Handb Exp Pharmacol.* 231:341-65.
10. Bonz A, Laser M, Küllmer S, Kniesch S, Babin-Ebell J, Popp V, Ertl G, Wagner JA. (2003) Cannabinoids acting on CB1 receptors decrease contractile performance in human atrial muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 41(4):657-64.
11. Booker L, Kinsey SG, Abdullah RA, Blankman JL, Long JZ, Ezzili C, Boger DL, Cravatt BF, Lichtman AH. (2012) The fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitor PF-3845 acts in the nervous system to reverse LPS-induced tactile allodynia in mice. *Br J Pharmacol.* 165(8):2485-96
12. Braga J. (2016). Evaluación metabólica y efecto antioxidante de camu camu y maca como nutraceuticos en jóvenes de 18 a 25 años de la Amazonía peruana. Tesis Doctoral. Universidad Peruana Cayetano Heredia.
13. Brown GC, Borutaite V. (2001) Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life.* 52(3-5):189-95.
14. Centonze D, Finazzi-Agrò A, Bernardi G, Maccarrone M. (2007) The endocannabinoid system in targeting inflammatory neurodegenerative diseases. *Trends Pharmacol Sci.* 28(4):180-7.
15. Chioccarelli T, Cacciola G, Altucci L, Lewis SE, Simon L, Ricci G, Ledent C, Meccariello R, Fasano S, Pierantoni R, Cobellis G. (2010) Cannabinoid receptor 1 influences chromatin remodeling in mouse spermatids by affecting content of transition protein 2 mRNA and histone displacement. *Endocrinology.* 151(10):5017-29.

16. Chung F, Rubio J, Gonzales C, Gasco M, Gonzales GF. (2005) Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. *J Ethnopharmacol.* 98(1-2):143-7.
17. Cottone E, Forno S, Campantico E, Guastalla A, Viltono L, Mackie K, Franzoni MF. (2005) Expression and distribution of CB1 cannabinoid receptors in the central nervous system of the African cichlid fish *Pelvicachromis pulcher*. *J Comp Neurol.* 485(4):293-303.
18. De Ferrari A, Miranda JJ, Gilman RH, et al. (2014); CRONICAS Cohort Study Group. Prevalence, clinical profile, iron status, and subject-specific traits for excessive erythrocytosis in andean adults living permanently at 3,825 meters above sea level. *Chest.* (5):1327-1336.
19. De Petrocellis, L., Melck, D., Bisogno, T., Milone, A. Di Marzo, V. (1999) Finding of the endocannabinoid signalling system in Hydra, a very primitive organism: possible role in the feeding response. *Neuroscience* 92: 377–387.
20. del Carmen García M, Adler-Graschinsky E, Celuch SM. (2003) Hypotensive effect of anandamide through the activation of CB1 and VR1 spinal receptors in urethane-anesthetized rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 368(4):270-6.
21. Deutsch DG, Chin SA. (1993) Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. *Biochem Pharmacol.* 46(5):791-6.
22. Devane WA, Dysarz FA 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol.* 34(5):605-13.
23. Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science.* 258(5090):1946-9.
24. Devane, W.A. (1989). The discovery of a cannabinoid receptor. Doctorate Thesis. Bibliographic information available from INIS:

http://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:22003521; University
Microfilms, PO Box 1764, Ann Arbor, MI 48106, Order No.90-00,904

25. Dietrich A, McDaniel WF. (2004) Endocannabinoids and exercise. *Br J Sports Med.* 38(5):536-41.
26. Dmitrieva N, Berkley KJ. (2002) Contrasting effects of WIN 55212-2 on motility of the rat bladder and uterus. *J Neurosci.* 22(16):7147-53.
27. Elphick MR, Egertová M. (2001) The neurobiology and evolution of cannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29;356(1407):381-408.
28. Elphick MR. (2012) The evolution and comparative neurobiology of endocannabinoid signalling. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 5;367(1607):3201-15.
29. Engeli S, Blüher M, Jumpertz R, Wiesner T, Wirtz H, Bosse-Henck A, Stumvoll M, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Kunos G, Jordan J. (2012) Circulating anandamide and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *J Hypertens.* 30(12):2345-51.
30. Facci L, Dal Toso R, Romanello S, Buriani A, Skaper SD, Leon A. (1995) Mast cells express a peripheral cannabinoid receptor with differential sensitivity to anandamide and palmitoylethanolamide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11;92(8):3376-80.
31. Ferguson SS. (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev.* 53(1):1-24.
32. Filmore D. (2004) It's a GPCR world. *Modern drug discovery* 7(11).
33. Frisancho AR (2013) Developmental Functional Adaptation to High Altitude: Review. *American Journal of Human Biology* 25:151–168.
34. Galiègue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carrière D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P. (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem.* 15;232(1):54-61.

35. 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*. Aug;39(4):151-8.
36. Ghanemi A. (2015) Targeting G protein coupled receptor-related pathways as emerging molecular therapies. *Saudi Pharm J*. 23(2):115-29.
37. Godlewski G, Alapafuja SO, Bátkai S, Nikas SP, Cinar R, Offertáler L, Osei-Hyiaman D, Liu J, Mukhopadhyay B, Harvey-White J, Tam J, Pacak K, Blankman JL, Cravatt BF, Makriyannis A, Kunos G. (2010) Inhibitor of fatty acid amide hydrolase normalizes cardiovascular function in hypertension without adverse metabolic effects. *Chem Biol*. 24;17(11):1256-66.
38. Gonzales C, Cárdenas-Valencia I, Leiva-Revilla J, Anza-Ramirez C, Rubio J, Gonzales GF. (2010) Effects of different varieties of Maca (*Lepidium meyenii*) on bone structure in ovariectomized rats. *Forsch Komplementmed*. 2010;17(3):137-43.
39. Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. (2006) Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *J Ethnopharmacol*. Feb 20;103(3):448-454.
40. Gonzales GF, Chaupis D. (2015) Higher androgen bioactivity is associated with excessive erythrocytosis and chronic mountain sickness in Andean Highlanders: a review. *Andrologia*.47(7):729-743.
41. Gonzales GF, Gasco M, Lozada-Requena I. (2013) Role of maca (*Lepidium meyenii*) consumption on serum interleukin-6 levels and health status in populations living in the Peruvian Central Andes over 4000 m of altitude. *Plant Foods Hum Nutr*. 2013 Dec;68(4):347-51.
42. Gonzales GF, Gonzales C. (2011) Compositions of atomized or lyophilized maca (*Lepidium meyenii*) extracts and atomized or lyophilized yacon (*Smallanthus sanchifolius*) extracts as adjuvants in the treatment of different conditions. Patent US7985434B2 US Grant.

43. Gonzales GF, Tapia V. (2013) Association of high altitude-induced hypoxemia to lipid profile and glycemia in men and women living at 4,100m in the Peruvian Central Andes. *Endocrinol Nutr.* 60(2):79-86.
44. Gonzales GF, Tapia V. (2013) Association of high altitude-induced hypoxemia to lipid profile and glycemia in men and women living at 4,100m in the Peruvian Central Andes. *Endocrinol Nutr.* 60(2):79-86.
45. Gonzales GF, Villaorduña L, Gasco I, Rubio J, Gonzales C. (2014) Maca (*Lepidium meyenii* Walp), a review of its biological properties. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 31(1):100-10.
46. Gonzales GF. (2013) Serum testosterone levels and excessive erythrocytosis during the process of adaptation to high altitudes. *Asian J Androl.* 15(3):368-74.
47. Gupta RC. (2012) *Veterinary principles: Basic and clinical principles.* Pp 287-291. Academic Press, 23 abr. 2012 – 1454 pp.
48. Gye MC, Kang HH, Kang HJ. (2005) Expression of cannabinoid receptor 1 in mouse testes. *Arch Androl.* 51(3):247-55.
49. Hajdu Z, Nicolussi S, Rau M, Lorántfy L, Forgo P, Hohmann J, Csupor D, Gertsch J. (2014) Identification of endocannabinoid system-modulating N-alkylamides from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* and *Lepidium meyenii*. *J Nat Prod.* 25;77(7):1663-9.
50. Hartinger S, Tapia V, Carrillo C, Gonzales GF. (2006). Birth weight at high altitudes in Peru. *Int J Gynaecol Obstet.*93(3):275-81.
51. Hayes AC, Stupak J, Li J, Cox AD. (2013) Identification of N-acyl ethanolamines in *Dictyostelium discoideum* and confirmation of their hydrolysis by fatty acid amide hydrolase. *J Lipid Res.* 54(2):457-66.
52. Hohmann AG, Suplita RL 2nd. (2006) Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* 8(4):E693-708.

53. Howlett, A.C., Mukhopadhyay, S., Wilken, G.H. Neckamyer, W.S. (2000) A cannabinoid receptor in *Drosophila* is pharmacologically unique. *Soc. Neurosci. Abstracts* 26: 2165.
54. Idris AI, van 't Hof RJ, Greig IR, Ridge SA, Baker D, Ross RA, Ralston SH. (2005) Regulation of bone mass, bone loss and osteoclast activity by cannabinoid receptors. *Nat Med.* 11(7):774-9.
55. Jefferson JA, Simoni J, Escudero E, Hurtado ME, Swenson ER, Wesson DE, Schreiner GF, Schoene RB, Johnson RJ, Hurtado A. (2004) Increased oxidative stress following acute and chronic high altitude exposure. *High Alt Med Biol.* Spring;5(1):61-9.
56. Jueptner M, Weiller C. (1998) A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movements as revealed by functional imaging studies. *Brain.* 121 (Pt 8):1437-49.
57. Kang JG, Park CY. (2012) Anti-Obesity Drugs: A Review about Their Effects and Safety. *Diabetes Metab J.* 36(1): 13–25.
58. Kano M, Ohno-Shosaku T, Hashimotodani Y, Uchigashima M, Watanabe M. (2009) Endocannabinoid-mediated control of synaptic transmission. *Physiol Rev.* Jan;89(1):309-80.
59. Kano M. (2014) Control of synaptic function by endocannabinoid-mediated retrograde signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 90(7):235-50.
60. Katona I, Rancz EA, Acsady L, Ledent C, Mackie K, Hajos N, Freund TF. (2001) Distribution of CB1 cannabinoid receptors in the amygdala and their role in the control of GABAergic transmission. *J Neurosci.* Dec 1;21(23):9506-18.
61. Klimenko NA, Tatarko SV. (1995) The role of mast cells in regenerative phenomena in inflammation. *Biull Eksp Biol Med.* 119(3):262-5.

62. Kreitzer AC, Regehr WG. (2001) Retrograde inhibition of presynaptic calcium influx by endogenous cannabinoids at excitatory synapses onto Purkinje cells. *Neuron*. Mar;29(3):717-27.
63. Kruk-Slomka M, Boguszevska-Czubara A, Slomka T, Budzynska B, Biala G. (2016) Correlations between the Memory-Related Behavior and the Level of Oxidative Stress Biomarkers in the Mice Brain, Provoked by an Acute Administration of CB Receptor Ligands. *Neural Plast*. 2016:9815092
64. Lambert DM, Di Marzo V. (1999) The palmitoylethanolamide and oleamide enigmas : are these two fatty acid amides cannabimimetic? *Curr Med Chem*. 6(8):757-73.
65. Leiva-Revilla J, Guerra-Castañon F, Olcese-Mori P, Lozada I, Rubio J, Gonzales C, Gonzales GF. (2014) Effect of red maca (*Lepidium meyenii*) on INF- γ levels in ovariectomized rats. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 31(4):683-8.
66. León-Velarde F, Maggiorini M, Reeves JT, (2005) Consensus statement on chronic and subacute high altitude diseases. *High Alt Med Biol*. Summer;6(2):147-157.
67. Leon-Velarde F, Monge C. (1998) Mal de montaña crónico. *Acta Andina* ; 7(2) : 137-145.
68. Liu P, Bilkey DK, Darlington CL, Smith PF. (2003) Cannabinoid CB1 receptor protein expression in the rat hippocampus and entorhinal, perirhinal, postrhinal and temporal cortices: regional variations and age-related changes. *Brain Res*. 25;979(1-2):235-9.
69. Mechoulam R, Gaoni Y. (1964) Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. *Tetrahedron*. 21(5):1223-9.
70. Melnikovova I, Fait T, Kolarova M, Fernandez EC, Milella L. (2015) Effect of *Lepidium meyenii* Walp. on Semen Parameters and Serum Hormone Levels in Healthy Adult Men: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. *Evid Based Complement Alternat Med*:324369.
71. Miller MR, Mannowetz N, Iavarone AT, Safavi R, Gracheva EO, Smith JF, Hill RZ, Bautista DM, Kirichok Y, Lishko PV. (2016) Unconventional endocannabinoid

- signaling governs sperm activation via sex hormone progesterone. *Science*. Mar 17. [Epub ahead of print]
72. Niermeyer S, Andrade-M MP, Vargas E, Moore LG. (2015) Neonatal oxygenation, pulmonary hypertension, and evolutionary adaptation to high altitude *Circ*. 5(1):48-62.
73. Ohno-Shosaku T, Maejima T, Kano M. Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals.
74. Osei-Hyiaman D, Harvey-White J, Bátkai S, Kunos G. (2006) The role of the endocannabinoid system in the control of energy homeostasis. *Int J Obes (Lond)*. 30 Suppl 1:S33-8.
75. Palermo G, Campomanes P, Neri M, Piomelli D, Cavalli A, Rothlisberger U, De Vivo M. (2013) Wagging the Tail: Essential Role of Substrate Flexibility in FAAH Catalysis. *J Chem Theory Comput*. 9(2):1202-13.
76. Paria BC, Das SK, Dey SK. (1995) The preimplantation mouse embryo is a target for cannabinoid ligand-receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10;92(21):9460-4.
77. Peacock AJ. (1998) ABC of oxygen: oxygen at high altitude. *BMJ*. 17;317(7165):1063-10664.
78. Peñaloza D. (2012) Effects of high-altitude exposure on the pulmonary circulation. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 65(12):1075-8.
79. Pertwee RG. (2001) Cannabinoids and the gastrointestinal tract. *Gut*. Jun;48(6):859-67.
80. Ravi J, Sneha A, Shilo K, Nasser MW, Ganju RK. (2014) FAAH inhibition enhances anandamide mediated anti-tumorigenic effects in non-small cell lung cancer by downregulating the EGF/EGFR pathway. *Oncotarget*. 15;5(9):2475-86.
81. Ricci G, Cacciola G, Altucci L, Meccariello R, Pierantoni R, Fasano S, Cobellis G. (2007) Endocannabinoid control of sperm motility: the role of epididymus. *Gen Comp Endocrinol*. 153(1-3):320-2.

82. Richalet JP, Rivera M, Bouchet P, Chirinos E, Onnen I, Petitjean O, Bienvenu A, Lasne F, Moutereau S, León-Velarde F. (2005) Acetazolamide: a treatment for chronic mountain sickness. *Am J Respir Crit Care Med.* 1;172(11):1427-33.
83. Rouzer CA, Marnett LJ. (2011) Endocannabinoid oxygenation by cyclooxygenases, lipoxygenases, and cytochromes P450: cross-talk between the eicosanoid and endocannabinoid signaling pathways. *Chem Rev.*111(10):5899-921.
84. Rubio J, Qiong W, Liu X, Jiang Z, Dang H, Chen SL, Gonzales GF. (2011) Aqueous Extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on Memory Impairment Induced by Ovariectomy in Mice. *Evid Based Complement Alternat Med*;2011:253958.
85. Ruiz-Llorente L, Sánchez MG, Carmena MJ, Prieto JC, Sánchez-Chapado M, Izquierdo A, Díaz-Laviada I. (2003) Expression of functionally active cannabinoid receptor CB1 in the human prostate gland. *Prostate.* 1;54(2):95-102.
86. Sakin YS, Dogrul A, Ilkaya F, Seyrek M, Ulas UH, Gulsen M, Bagci S. (2015) The effect of FAAH, MAGL, and Dual FAAH/MAGL inhibition on inflammatory and colorectal distension-induced visceral pain models in Rodents. *Neurogastroenterol Motil.* 27(7):936-44.
87. Salio C, Cottone E, Conrath M, Franzoni MF. (2002) CB1 cannabinoid receptors in amphibian spinal cord: relationships with some nociception markers. *J Chem Neuroanat.* 24(3):153-62.
88. Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE.(1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol.* 142(2):278-87.
89. Stefano GB, Bilfinger TV, Rialas CM, Deutsch DG. (2000) 2-arachidonyl-glycerol stimulates nitric oxide release from human immune and vascular tissues and invertebrate immunocytes by cannabinoid receptor 1. *Pharmacol Res* 42(4):317-22

90. Stefano, G.B., Liu, Y. & Goligorsky, M.S. (1996) Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J. Biol. Chem.* 271: 19238–19242.
91. Steiner H, Bonner TI, Zimmer AM, Kitai ST, Zimmer A. (1999) Altered gene expression in striatal projection neurons in CB1 cannabinoid receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*;96(10):5786-90.
92. Stincic TL, Hyson RL. (2008) Localization of CB1 cannabinoid receptor mRNA in the brain of the chick (*Gallus domesticus*). *Brain Res.* 15;1245:61-73.
93. Strewé C, Feurecker M, Nichiporuk I, Kaufmann I, Hauer D, Morukov B, Schelling G, Chouker A. (2012) Effects of parabolic flight and spaceflight on the endocannabinoid system in humans. *Rev Neurosci.*;23(5-6):673-80.
94. Toczek M, Baranowska-Kuczko M, Grzęda E, Pędzińska-Betiuk A, Weresa J, Malinowska B. (2016) Age-specific influences of chronic administration of the fatty acid amide hydrolase inhibitor URB597 on cardiovascular parameters and organ hypertrophy in DOCA-salt hypertensive rats. *Pharmacol Rep.* Apr;68(2):363-9.
95. Torre-Bouscoulet L, Castorena-Maldonado A, Baños-Flores R, Vázquez-García JC, Meza-Vargas MS, Pérez-Padilla R. (2007) Agreement between oxygen desaturation index and apnea-hypopnea index in adults with suspected obstructive sleep apnea at an altitude of 2240 m. *Arch Bronconeumol.* 43(12):649-54.
96. Trattner B, Berner S, Grothe B, Kunz L. (2013) Depolarization-induced suppression of a glycinergic synapse in the superior olivary complex by endocannabinoids. *J Neurochem.* 127(1):78-90.
97. Ueda N, Tsuboi K, Uyama T. (2013) Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. *FEBS J.* 280(9):1874-94.
98. Valk P, Verbakel S, Vankan Y, Hol S, Mancham S, Ploemacher R, Mayen A, Löwenberg B, Delwel R. (1997) Anandamide, a natural ligand for the peripheral

- cannabinoid receptor is a novel synergistic growth factor for hematopoietic cells. *Blood*. 15;90(4):1448-57.
99. Varga K, Lake KD, Huangfu D, Guyenet PG, Kunos G. (1996) Mechanism of the hypotensive action of anandamide in anesthetized rats. *Hypertension*. 28(4):682-6.
100. Violin JD, Crombie AL, Soergel DG, Lark MW. (2014) Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends in pharmacological sciences*. Volume 35, Issue 7, p308–316.
101. Wahn H, Wolf J, Kram F, Frantz S, Wagner JA. (2005) The endocannabinoid arachidonyl ethanolamide (anandamide) increases pulmonary arterial pressure via cyclooxygenase-2 products in isolated rabbit lungs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 289(6).
102. Wang B, Zhang Y-B, Zhang F, Lin H, Wang X, Wan N, et al. (2011) On the Origin of Tibetans and Their Genetic Basis in Adapting High-Altitude Environments. *PLoS ONE* 6(2): e17002.
103. Williams CM, Kirkham TC. (1999) Anandamide induces overeating: mediation by central cannabinoid (CB1) receptors. *Psychopharmacology (Berl)*. 143(3):315-7.
104. Wu H, Kelley CJ, Pino-Figueroa A, Vu HD, Maher TJ. (2013) Macamides and their synthetic analogs: evaluation of in vitro FAAH inhibition. *Bioorg Med Chem*.
105. Wu T, Wang X, Wei C, et al. (2005) Hemoglobin levels in Qinghai-Tibet: different effects of gender for Tibetans vs. Han. *J Appl Physiol* 98(2):598-604.
106. Xiao L, Chen Y, Zhang J, Wang B. (2014) Mechanism of endocannabinoids system in glucose metabolism of rats with chronic intermittent hypoxia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 27;94(20):1581-3.
107. Yang Q, Jin W, Lv X, Dai P, Ao Y, Wu M, Deng W, Yu L (2016) Effects of macamides on endurance capacity and anti-fatigue property in prolonged swimming mice. *Pharm Biol*. May;54(5):827-34.

108. Zheng BL, Kim CH, Wolthoff S, He K, Rogers L, Shao Y, Yi Zheng Q. (2000) Extract of *Lepidium meyenii* roots for pharmaceutical applications. Patent US6267995B1 US Grant.
109. Zheng, B.L., He, K., Kim, C.H., Rogers, L., Shao, Y., Huang, Z.Y., Lu, Y., Yan, S.J., Qien, L.C., Zheng, Q.Y., (2000) Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior of mice and rats. *Urology* 55, 598–602.

ANEXO N° 1B

FORMATO DE CONSENTIMIENTO

INSTITUCIONES: Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima, Universidad Nacional del Altiplano en Puno y Universidad de la Amazonía Peruana en Iquitos.

INVESTIGADORES: M.Sc. Lidia Caballero G., Dra. Janeth Braga, Dr. Gustavo Gonzáles R.

TÍTULO: PATRONES DE CONSUMO ALIMENTARIO, ESTADO NUTRICIONAL Y CARACTERÍSTICAS METABOLÓMICAS DEL HABITANTE A NIVEL DEL MAR Y ALTURA DEL PERÚ.

PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Lo estamos invitando a participar en el estudio “Patrones de consumo alimentario, estado nutricional y características metabólicas del habitante a nivel del mar y altura del Perú”, el mismo será desarrollado por investigadores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Universidad Nacional del Altiplano en Puno y Universidad de la Amazonía Peruana en Iquitos. Este estudio se llevará a cabo en varones y mujeres adultas tanto en Iquitos como en Puno.

El objetivo de este estudio es analizar las asociaciones y diferencias entre el patrón de consumo alimentario e ingesta de nutrientes con las características metabólicas, estado nutricional y composición corporal del poblador habitante a nivel del mar y de altura.

El estudio se justifica en el sentido que cuando usted consume una dieta, los alimentos y bebidas se constituyen en un vehículo de nutrientes; proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas y minerales que van a ejercer un efecto a corto y a largo plazo en su estado de nutrición y salud. Estos nutrientes al ser consumidos en exceso o en déficit van a determinar su composición corporal y funcionalidad de su organismo, respecto a cantidad de grasa, músculo, así como en la forma corporal. Todos estos aspectos, pueden ser medibles y uno de los métodos que permiten conocer cuál es la característica funcional del organismo es la metabólica, que permite conocer las diversas sustancias en sangre y analizar metabolitos o sustancias indicativos de la funcionalidad orgánica total.

Estos resultados, en conjunto, ayudarán a responder diversas interrogantes sobre su estado nutricional, calidad de su dieta, nivel de grasas y/o lípidos en sangre, niveles de glucosa en sangre, metabolitos de mayor circulación en sangre, y su relación con el



APROBADO

FECHA APROBACIÓN: 28.09/2014

estado de salud. Aspectos que podrían ser conocidos en razón a los resultados de este estudio, al cual le invitamos a participar.

PROCEDIMIENTOS:

Si usted acepta participar en el estudio, se le solicitará información nutricional, alimentaria y antropométrica según lo siguiente:

1. Se le aplicará un cuestionario detallado sobre patrones de consumo alimentario, la aplicación la realizará un profesional capacitado para estos fines. Se realizará en un tiempo no mayor a 30 minutos, por una vez.
2. Se le solicitará llenar, ajustándose a la verdad, un registro de los alimentos y preparaciones que consume durante dos días regulares de la semana y un fin de semana, el mismo deberá ser llenado conforme a lo que come en cada momento del día. Permanentemente podrá ser orientado al respecto, llamando a los teléfonos que figuran en este formato.
3. Se le solicitará responder a un cuestionario corto sobre la actividad física que desarrolla durante los días de la semana. La aplicación tarda 5 minutos.
4. Se le solicitará responder una encuesta de salud y un cuestionario sobre síntomas de mal de montaña en pobladores de los andes, con un tiempo de duración de 5 minutos.
5. Según la disponibilidad de su tiempo, se programará la realización de mediciones antropométricas de peso, talla, longitudes de brazos y piernas, anchura y circunferencias de hombros, cintura y caderas. Estas mediciones permitirán determinar varios índices relacionados con su estado nutricional y composición de su cuerpo, para lo cual deberá disponer de 30 minutos y acercarse preparado con la menor cantidad de ropa para facilitar las mediciones.
6. En la misma sesión, utilizando un equipo (bioimpedanciómetro), que no determina ningún riesgo para su salud, se determinará la cantidad de grasa y músculo, la medición tarda 40 segundos.
7. El tiempo total de su participación en este estudio no será mayor de una hora y 30 minutos.
8. Para el estudio metabólico, se le solicitará una (01) muestra única de sangre de 15 ml por vía venosa (aproximadamente 3 cucharitas) en ayunas. La muestra será obtenida por personal de salud capacitado para este proceso. Se utilizarán materiales nuevos, estériles y descartables. La muestra será utilizada para analizar las características metabólicas, marcadores hepáticos, renales, inflamatorios, marcadores hematológicos; glicemia, lípidos en sangre e insulina.

RIESGOS Y PRECAUCIONES

Usted sentirá un breve dolor durante la venopunción y un pequeño riesgo de moretón o sangrado bajo la piel en el sitio de la punción. La ocurrencia de sangrado, puede ser minimizada levantando el brazo usado para la toma de muestra o aplicando presión en el sitio de la punción después que el catéter es retirado del brazo.

El volumen total de sangre a extraer será de 15 ml. (aproximadamente 3 cucharitas), para todas las pruebas descritas.



APROBADO
28/09/2014
E. APROBACIÓN

La duración del estudio, incluidos los procedimientos descritos, está calculado en 10 minutos para la toma de sangre, 30 minutos para la realización de encuestas, 30 minutos para los registros antropométricos y por bioimpedanciometría.

Podría haber riesgos adicionales que no podemos predecir en este momento. Pero personal de salud altamente capacitado estará presente durante las pruebas para monitorear su salud.

Estos resultados, le permitirán conocer cuál es su estado de salud y cómo prevenir eventuales enfermedades. Para ello recibirá la orientación necesaria por profesionales especialistas. Esta información será de manera personal y muy confidencial. Se sugerirá su asistencia a los servicios de salud correspondientes, en caso de necesitar algún apoyo profesional.

COSTOS E INCENTIVOS

Su participación en este estudio, no tendrá ningún costo para Usted. De igual forma, no recibirá ningún incentivo económico, pero nos permitirá tener más conocimiento sobre las características alimentarias y su influencia en los procesos metabólicos.

CONFIDENCIALIDAD:

Nosotros guardaremos su información con códigos y no con nombres. Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas que participan en este estudio. Sus archivos no serán mostrados a ninguna persona ajena al estudio sin su consentimiento.

DERECHOS DEL PACIENTE:

La participación en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted no tiene que participar si no lo desea. Si usted decide participar en el estudio, puede retirarse de éste en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin perjuicio alguno, sin tener que dar explicaciones, nadie le preguntará por qué no desea participar.

Si tiene alguna pregunta o duda sobre el proyecto, puede contactarse con el **Dr. Gustavo Gonzáles Rengifo**, investigador principal del proyecto al teléfono (01)319 0000 2515 o a la MSc. Lidia Caballero Gutiérrez al teléfono 951052792.

Si tiene preguntas sobre los aspectos éticos del estudio, o cree que ha sido tratado injustamente puede contactar al **Dr. Fredy Canchihumán**, Presidente del Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, al teléfono 319-0000 anexo 2271.

CONSENTIMIENTO

Este estudio me ha sido explicado. He tenido la oportunidad de hacer preguntas. Acepto voluntariamente participar en el estudio. Entiendo que puedo negarme a participar o retirarme del estudio en cualquier momento, sin tener que dar explicaciones y sin que por ello se me sancione. Si luego tengo más preguntas acerca del estudio, puedo comunicarme con la investigadora, al teléfono arriba indicado.



APROBADO

28/09/2014
F. APROBACIÓN

tengo preguntas acerca de mis derechos como participante en esta investigación, o me parece que he sido tratado injustamente, puedo comunicarme con el presidente del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, al teléfono arriba mencionado.

Me entregarán una copia de este consentimiento.

Firma del Participante		Fecha
Nombre:	Huella digital	
DNI:		

Declaración del Investigador:

Yo declaro que el participante ha leído la descripción del proyecto, he aclarado sus dudas sobre el estudio, y ha decidido participar voluntariamente en él. Se le ha informado que los datos que provea se mantendrán anónimos y que los resultados del estudio serán utilizados para fines de investigación.

Investigador	Fecha
Nombre:	
DNI:	



APROBADO
E. APROBACIÓN: 28/09/2014

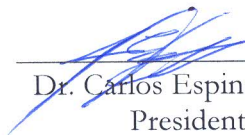



CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE INICIO DE EJECUCIÓN DEL PROYECTO

El que suscribe, Presidente del Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales CIEA de la Universidad Peruana Cayetano Heredia certifica, que el Proyecto de Investigación, versión de fecha 07 de abril del 2016, titulado **“Efecto de AM251, bloqueador del receptor endocannabinoide CB1, en la respuesta biológica a la maca negra en ratones machos adultos.”**. Código de inscripción **66587**, presentado por la Investigadora principal **Srta. Dulce Esperanza Alarcón Yaquetto**; La aprobación en mención fue aprobada en la sesión del CIEA del 01 de junio del 2016.

Esta aprobación tendrá **vigencia hasta el 31 de mayo del 2017**. Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 01 de junio del 2016


Dr. Carlos Espinoza Monte
Presidente
Comité Institucional de Ética para
el uso de Animales - CIEA



CONS-CIEA-018-2016

/Tatiana