



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**EFEECTO DEL EXTRACTO  
METANÓLICO Y LAS FRACCIONES  
ACUOSA Y BUTANÓLICA DE *Lepidium  
meyenii* VARIEDAD ROJA SOBRE LA  
FUNCIÓN RENAL EN RATAS  
SPRAGUE-DAWLEY MACHO  
TRATADAS DURANTE 90 DÍAS**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN FISILOGIA

JEANETTE MARLENE BERNUY HURTADO

LIMA - PERU

2017



JURADO DE TESIS:

DR. JAVIER A. CIEZA ZEVALLOS	Presidente
DRA. CESAR ANTONIO LOZA MUNARRIZ	Vocal
DRA. ROSSANA MORALES GUZMAN BARRON	Secretaria

Asesor:

Dr. Gustavo F. Gonzales Rengifo

*A mis amados padres: Doris y Nicolás*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Gustavo Gonzales Rengifo por su constante asesoría y por brindarme las facilidades para poder realizar el presente trabajo.

Al personal de Laboratorio de Reproducción del LID que de manera gentil y desinteresada me brindaron su apoyo.

A las alumnas Reyna, Laura, Jelly y Karolyne por sacrificar algunos fines de semana para ayudarme con el cuidado de los animales de experimentación.

A mis padres por alentarme día a día hasta lograr una meta propuesta.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

El presente trabajo ha sido financiado por el Círculo de Investigación de Plantas con Efectos en Salud – Fondecyt.

## INDICE DE MATERIAS

Página

Índice de Fotos.....	<i>i</i>
Índice de Tablas.....	<i>ii</i>
Índice de Figuras.....	<i>ii</i>
Abreviaturas.....	<i>iii</i>
1. Resumen /palabras clave.....	<i>iv</i>
2. Introducción.....	1
3. Planteamiento de la investigación.....	4
3.1 Planteamiento del problema.....	4
3.2 Marco teórico.....	5
3.3 Justificación del estudio.....	8
3.4 Hipótesis.....	9
4. Objetivos.....	10
4.1 Generales.....	10
4.2 Específicos.....	10
5. Metodología.....	12
5.1 Diseño de estudio.....	12
5.2 Población.....	12
5.3 Muestra.....	12
5.4 Tamaño muestral.....	13
5.5 Operacionalización de variables.....	13
5.6 Procedimientos y técnicas.....	17

5.7 Consideraciones éticas.....	25
5.8 Plan de análisis.....	25
6 Resultados.....	27
6.1. Peso de riñones y peso corporal.....	27
6.2 Hallazgos hematológicos.....	27
6.3 Analítica sérica.....	28
6.4 Volumen urinario.....	28
6.5 Tira reactiva de orina.....	28
6.6 Histología renal.....	29
7 Discusión.....	30
7.1 Peso de riñones y peso corporal.....	30
7.2 Hallazgos hematológicos.....	32
7.3 Analítica sérica.....	34
7.4 Volumen urinario.....	37
7.5 Tira reactiva de orina.....	38
7.6 Histología renal.....	38
7.7 Fortalezas del estudio.....	39
7.8. Limitaciones del estudio.....	40
8 Conclusiones.....	41
9 Recomendaciones.....	42
10 Referencias bibliográficas.....	43
11 Anexos.....	

## ÍNDICE DE FOTOS

Foto N° 1. Jaula metabólica. Vista anterior

Foto N° 2. Jaula metabólica. Vista posterior

Foto N° 3. Jaula metabólica. Área de bebedero y comida

Foto N° 4. Jaula metabólica. Vista inferior

Foto N° 5. Recolección de orina en jaulas metabólicas individuales

Foto N° 6. Grupo Control. Glomérulo y túbulos

Foto N° 7. Grupo Control. Glomérulo y túbulos

Foto N° 8. Grupo Metanólico. Glomérulo y túbulos

Foto N° 9. Grupo Metanólico. Glomérulo y túbulos

Foto N°10. Grupo Acuoso. Glomérulo y túbulos

Foto N°11. Grupo Acuoso. Glomérulo y túbulos

Foto N° 12. Grupo Butanólico. Glomérulo y túbulos

## INDICE DE TABLAS

- Tabla N°1. Ficha de recolección de datos de score histológico
- Tabla N°2. Pesos al inicio de la inoculación, final, delta de peso.
- Tabla N°3. Pesos según la semana de tratamiento
- Tabla N°4. Pesos de riñones según grupos
- Tabla N°5. Variables Hematológicas
- Tabla N°6. Variables Bioquímicas
- Tabla N°7. Otras variables bioquímicas
- Tabla N°8. Resultados de tira reactiva de orina según el grupo
- Tabla N°9. Resultados de la histología renal según un score de daño
- Tabla N°10 Volumen glomerular según grupos

## INDICE DE GRAFICOS

- Gráfico N°1. Calcio sérico total según grupos
- Gráfico N°2. Volumen urinario de 24 horas al término del estudio

## ABREVIATURAS

1. FONDECYT: Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico.
2. MTHC: Metil tetrahidro  $\beta$  carbolina
3. OECD: Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos
4. RPM: Revoluciones por minuto

## 1. Resumen:

**Introducción:** La fracción n-butanólica del extracto metanólico de maca contiene alcaloides que se ha sugerido pueden ser tóxicos. **Objetivo:** conocer el efecto de la administración del extracto metanólico y la fracción acuosa y butanólica de maca roja por vía orogástrica sobre la función renal de ratas Sprague-Dawley macho durante 90 días. **Métodos:** Se distribuyeron en: Grupo 1: control (agua destilada), Grupo 2: (1g de extracto metanólico de maca roja/k/día), Grupo 3: (0.89gr de fracción acuosa de extracto metanólico /k/día), Grupo 4: (0.11g fracción butanólica de extracto metanólico /k/día). Se comparó la bioquímica renal, volumen urinario de 24 horas y la histología renal con el programa estadístico STATA V.14 **Resultados:** El peso final, peso de riñones, hemoglobina final e histología fueron similares. El conteo de plaquetas fue menor en el grupo que recibió fracción butanólica. La glucosa sérica fue menor en el grupo que recibió fracción acuosa y fracción butanólica (P=0.0021). El calcio sérico total fue menor con el extracto metanólico y fracción butanólica de maca roja respecto al control y al grupo con fracción acuosa de maca (P=0.0003). Todos los valores estuvieron dentro del rango de normalidad. El volumen urinario fue mayor en el grupo tratado con fracción acuosa comparado con el grupo control (P=0.028). **Conclusiones:** No hubo diferencias en la filtración glomerular evaluada como creatinina sérica, ni en la histología renal en los grupos que recibieron extracto metanólico o las fracciones acuosa o butanólica de maca roja. El grupo que recibió fracción acuosa tuvo mayor volumen urinario que el grupo control. **Palabras claves:** *Lepidium meyenii*, extracto metanólico, fracción acuosa, butanólica, riñón, calcio.

## 1. Summary

**Introduction:** The n-butanol fraction of maca methanolic extract contains alkaloids and it has been suggested, they might be toxic. **Objective:** to know the effect of methanolic extract and aqueous and butanolic fractions of red maca received by orogastric gavage over renal function in male Sprague-Dawley rats treated during 90 days. **Methods:** the animals were divided in: Group 1: distilled water, group 2: 1gr of methanolic extract/k/day), group 3: (0.89gr of aqueous fraction/k/day), group 4: (0.11g of butanolic fraction/k/day). Biochemical and histological features and urine volume were compared by using STATA program V.14. **Results:** There were no differences in final weight, hemoglobin, kidney weights and histology. Platelet count was lower in butanolic group (P= 0.01). Serum total calcium was lower in the group that received methanolic extract and butanol fraction of red maca respect to control group and the aqueous group (P=0.0003). All values were within normal range. Urine volume was higher in the group receiving aqueous fraction than in control. (P= 0.028). Glucose levels were lower in butanolic and aqueous groups than control. (P= 0.0021). **Conclusions:** There were neither differences in glomerular filtration evaluated by serum creatinine, nor in histological findings after receiving methanolic extract or aqueous or butanolic fractions of red maca. Aqueous group had higher urine volume than control group. **Key words:** *Lepidium meyenii*, methanolic extract, aqueous fraction, butanolic fraction, kidney, calcium.

## 2. Introducción

La medicina tradicional y complementaria se ha empleado por diversas culturas: china, ayurvédica, unani, entre otras. (1)

Muchas de las plantas usadas tradicionalmente han sido objeto de investigación, lo que ha permitido comprobar beneficios en la salud aunque también se ha podido identificar ciertos efectos nocivos al ser consumidas. (2, 3,4)

*Lepidium meyenii*, maca, es una crucífera (Brassicaceae) de los andes peruanos, cuya primera descripción se publicó en el siglo XVI, por el cronista Cieza de León. (5)

El hipocótilo de la maca que crece al interior del suelo es la parte reservante y comestible.

El hipocótilo de esta planta consumida tradicionalmente luego de un proceso de secado natural (liofilizado natural), puede almacenarse por muchos años, manteniendo sus propiedades biológicas. Habitualmente los hipocótilos deshidratados se cuecen con agua, para luego ser consumidos. (5)

Desde el 2000, se han reportado múltiples beneficios por el consumo de maca tanto como extracto acuoso, hidroalcohólico, metanólico, como hexánico, en diferentes modelos experimentales. (6-9)

Estos estudios han permitido demostrar que su administración por vía oral produce un incremento en el recuento de espermatozoides, mejora de la memoria y la depresión, reducción de la glicemia, del perfil lipídico, y propiedades antivirales, entre otros. (10-13)

Muchas de estas propiedades además de ser evidenciadas en modelos animales han sido comprobadas en seres humanos. (14-17)

El hipocótilo seco de *Lepidium meyenii* contiene 59% de carbohidratos hidrolizables, 10.2% de proteínas, 2.5% de lípidos, 8.5% de fibra, 10.4% de agua y 4.9% de ceniza. Contiene un alto contenido de aminoácidos esenciales y ácidos linoléico, palmítico y oléico. (18)

Se han identificado varios metabolitos secundarios que podrían ser responsables de los efectos biológicos observados. Se ha descrito glucosinolatos, macamidas, metil tetrahidro beta carbolinas, flavonolignanós, entre otras. (19-22)

La metil tetrahidro beta carbolina de ácido carboxílico (MTHC), presente en la fracción butanólica de un extracto metanólico de maca ha sido relacionadas con efecto nocivos sobre el sistema nervioso central. (21)

A consecuencia de esta última publicación, las agencias alimentarias de Francia y Alemania pusieron una alerta acerca del consumo de maca. Sin embargo no se ha demostrado de manera sostenible dicha aseveración. Adicionalmente hay evidencia de la presencia de dicho compuesto en una gran variedad de frutos de consumo habitual, en los que no se ha descrito la presencia o desarrollo de algún efecto tóxico. (23,24)

Un reciente estudio no evidencia efecto tóxico en el recuento espermático por la administración de la fracción butanólica de maca negra o de maca amarilla por tres días. (25)

Hasta la fecha no existen estudios sobre el efecto de la maca sobre la función renal.

Se han reportado efectos de otras especies de *Lepidium* como *L. sativum* y *L. latifolium* sobre la función renal al producir un incremento en la diuresis, sin embargo no se han encontrado reportes sobre algún efecto benéfico o deletéreo

que *Lepidium meyenii* pueda tener sobre la función renal al ser consumida por corto o largo plazo. (26, 27)

Considerando que la MTHC tiene excreción urinaria, es posible que puedan tener un potencial efecto nocivo, por lo que es necesario evaluar el efecto sobre la función renal al consumir por periodos prolongados la maca en particular, la fracción butanólica del extracto metanólico de maca elaborada siguiendo el método de extracción desarrollado por Piacente. (21)

Además esta crucífera forma parte de la alimentación de la población peruana y adicionalmente es consumida en otros países y debe por tanto evaluarse algún daño potencial que alguno de sus metabolitos pudiera ocasionar, particularmente al ser consumida por periodos largos.

### 3. Planteamiento de la investigación:

#### 3.1 Planteamiento del problema:

El riñón tiene múltiples funciones, entre ellas, la excreción de productos del metabolismo de sustancias endógenas o exógenas, participar en la síntesis de hemoglobina a través de la hormona eritropoyetina, mantenimiento del balance de agua y electrolitos, de cationes mono como divalentes, contribuir a regular el estado ácido base, entre otros. La pérdida de estas funciones lleva a complicaciones que pueden llegar a ser mortales. (28, 29)

El incremento en la aceptación de la población mundial a la medicina tradicional ha llevado a un mayor consumo de plantas en diversas formas de preparación para el alivio o mejoría de ciertas patologías. (30)

Las publicaciones científicas sobre maca y la difusión de las mismas han permitido que pueda hacerse conocida y comercializada en diversos países, sin embargo los reportes de efectos deletéreos de uno de sus metabolitos secundarios, la MTHC, ha llevado a emitir ciertas restricciones o alarmas sobre su consumo. (21,31)

En estudios experimentales en ratones se observó que la ingestión de dosis menores a 15 g de maca molida/kg de peso/día por 7 días era inocua. (32)

Se ha evaluado los efectos de la administración de tres fenotipos de extracto acuoso hervido de maca por 6 semanas en ratas, evidenciándose propiedades benéficas según el fenotipo. El peso de hígado ni riñones del grupo que recibió extracto acuoso comparado con el grupo control fue similar. (33)

La administración de 1g de hipocótilos secos molidos/Kg. de peso/día durante 84 días en ratas, no mostró efectos nocivos y la histología hepática fue similar comparada con el grupo control. (34)

No se ha estudiado sin embargo, el efecto de compuestos específicos que podrían tal vez ser deletéreos para la salud. La idea del presente estudio es evaluar la fracción butanólica del extracto alcaloide de maca roja donde según Piacente se encuentran las metil tetrahydro  $\beta$  carbolinas de ácido carboxílico. (21)

Dado que las MTHCs tienen excreción renal y se encuentran presentes en la fracción butanólica del extracto metanólico de maca, surgió la necesidad de evaluar la función renal en el aspecto bioquímico e histológico al consumir por 90 días la fracción que contiene este alcaloide, pues no se encontraron reportes al respecto en modelos experimentales.

### 3.2 Marco teórico

La medicina tradicional y complementaria se ha empleado desde tiempos antiguos y actualmente su uso y aceptación en países industrializados se ha incrementado, ofreciendo una alternativa o complemento para el alivio de ciertos problemas de salud. (1)

Concomitantemente se han incrementado el número de publicaciones que reportan beneficios por el consumo de extractos o fracciones de extractos de plantas actuando como antioxidantes, reductores de glicemia, de colesterol, atenuando el daño producido por fármacos citotóxicos, y reductores de peso, entre otros. (5,35)

Por otro lado, a través de estudios en modelos experimentales se han reportado efectos deletéreos por el consumo de ciertas plantas, que si bien tienen algún efecto positivo, han mostrado producir toxicidad hepática y/o renal. (3,4)

Entre la amplia gama de plantas consumidas en nuestro país destaca *Lepidium meyenii*, una crucífera, descrita desde el siglo XVI, que ha sido por muchos años poco conocida, pero gracias al incremento y difusión de diversas investigaciones científicas, su consumo, demanda y producción han ido en aumento en las últimas décadas. (31)

Entre los metabolitos primarios presentes en la maca, se describen: proteínas entre 10.2 a 18%, con gran contenido de aminoácidos esenciales. Además presenta 32.6% de ácido linoléico, 23.8% de ácido palmítico y 11.1% de ácido oléico. También se han identificado varios tipos de vitaminas como pro-vitamina A, B1, B2, B6 y C. Se ha identificado hierro, zinc, calcio, cobre, bajos niveles de sodio y gran cantidad de potasio. **(18, 36)**

Dentro de los carbohidratos presentes en la maca, se ha obtenido polisacáridos hidrosolubles en extractos acuosos. Estos polisacáridos estuvieron constituidos por ramnosa, arabinosa, glucosa y galactosa. (37)

Se han identificado diversos metabolitos secundarios entre los que destacan los macaenos, macamidas, glucosinolatos, betahidro tetra carbolinas de ácido carboxílico, y flavonolignanos, entre otros. (5,38)

Los glucosinolatos no tienen actividad biológica por sí solos, pero al ser transformados en isotiocianatos o en los metabolitos de éstos, adquieren importante actividad biológica principalmente proapoptótica y antiproliferativa. (39)

Su excreción es renal, pudiendo servir sus metabolitos como biomarcador de la exposición a isotiocianatos. (40)

En el 2004 se generó una alerta en la Agencia Alimentaria Francesa sobre el consumo de maca debido a la publicación de Piacente sobre las MTHCs, quien sugería la presencia de un efecto aparentemente negativo sobre el sistema nervioso central. (21,31)

Las tetrahydro  $\beta$  carbolinas de ácido carboxílico, producto de la reacción de una indolamina y un aldehído, han sido identificadas en extractos de ajo, queso, leche, alimentos ahumados y en la fracción butanólica de *Lepidium Meyenii*. (21, 41)

Estudios realizados con ajo añejado, han mostrado efectos antioxidantes y favorables para la salud. (42,43) Adicionalmente se ha observado en modelos murinos el beneficio del consumo de ajo macerado en alcohol para reducir la presión arterial por un periodo de observación de 10 días. (44)

Luego de la administración de MTHC, se le ha podido identificar en tejido hepático, esplénico, cerebral, muscular, cardiaco y renal. Luego de 24 horas de administrado se pudo recuperar el 30% del compuesto en orina. No se identificó variaciones en la histología de estos órganos luego de la administración de MTHC por 6 semanas. (45)

Por otro lado, extractos metanólicos y acuosos de Brassicáceas como *Lepidium sativum* y *Lepidium latifolium*, tienen ciertas propiedades sobre la función renal, encontrándose efectos en la excreción renal de glucosa e incremento en el volumen urinario. Estos efectos han sido observados al administrar en algunos casos el extracto metanólico o acuoso por única vez y en otros al recibirlos por tres semanas. (25, 26, 46, 47)

A la fecha no se han encontrado reportes de evaluación del efecto de *Lepidium meyenii* en la función renal a excepción de una probable inhibición de la enzima convertidora de angiotensina en un estudio *in vitro*. (48) Adicionalmente se encontró cierto efecto antihipertensivo en mujeres postmenopáusicas. (17)

Otro aspecto relevante a considerar es que la variedad, el tipo de extracto o fracción empleados y el tiempo de consumo pueden guardar relación con sus propiedades. (5,49)

### 3.3 Justificación del estudio

El conocimiento de los efectos a nivel renal generado por el consumo de *Lepidium meyenii*, que tradicionalmente ha sido consumida por la población en el Perú, es útil y relevante porque ello contribuye al sostenimiento en su producción e incremento en su comercialización nacional e internacional si se comprueba el beneficio.

Si por el contrario se evidenciasen efectos tóxicos, se podría limitar su consumo, identificando el efecto no deseado a nivel renal.

Dado que existe un efecto diurético observado en otras especies del género *Lepidium*, es relevante evaluar si *Lepidium meyenii* comparte esta propiedad; ello permitirá así ampliar el conocimiento de sus propiedades y sus utilidades en otros campos además de los ya conocidos como el aspecto reproductivo.

El estudio del efecto de la maca sobre la función renal permitirá posteriormente evaluar el rol del consumo de dicho producto en situaciones en que ocurra enfermedad renal crónica.

### 3.4 Hipótesis

1. Existen diferencias en el efecto ocasionado por el consumo durante 90 días de un extracto metanólico de maca roja y de sus fracciones acuosa y butanólica sobre la función renal en ratas macho Sprague-Dawley comparado con el grupo control.
2. No se evidencian signos de toxicidad renal por el consumo durante 90 días de extracto metanólico, y sus fracciones, acuosa y butanólica de maca roja evaluado por histología renal en ratas macho Sprague-Dawley comparados con el grupo control.

## 4 Objetivos

### 4.1 General:

4.1.1. Determinar los efectos del consumo de extracto metanólico y sus fracciones, butanólica y acuosa de maca roja sobre la función renal en ratas Sprague-Dawley macho luego del consumo por 90 días.

4.1.2. Identificar la presencia de hallazgos histológicos anormales a nivel renal que sugiera toxicidad por el consumo del extracto metanólico, fracción acuosa o fracción butanólica de maca roja por 90 días en ratas macho Sprague-Dawley.

### 4.2 Específicos:

4.2.1 Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos: extracto metanólico, fracciones acuosa y butanólica de maca roja sobre la filtración glomerular medida como creatinina y urea séricas comparados con el grupo control.

4.2.2 Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos: extracto metanólico, fracciones acuosa y butanólica de maca roja sobre el medio interno evaluado mediante la medición de sodio, potasio, cloro, calcio, fósforo y magnesio séricos, comparados con el control.

4.2.3 Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos: extracto metanólico, fracciones, acuosa y butanólica de maca roja sobre la hematopoyesis medida a través del hemograma.

- 4.2.4 Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos: extracto metanólico, fracciones, acuosa y butanólica de maca roja sobre la glicemia, medida como glucosa sérica.
- 4.2.5 Evaluar el efecto de los diferentes tratamientos: extracto metanólico, fracciones, acuosa y butanólica de maca roja sobre la función tubular medida a través de la tira reactiva de orina para pH, gravedad específica, glucosa y proteínas en orina.
- 4.2.6 Evaluar el efecto crónico sobre la diuresis de los diferentes tratamientos: extracto metanólico, y sus fracciones acuosa y butanólica de maca roja comparados con el control.
- 4.2.7 Identificar la presencia de toxicidad renal de los diferentes tratamientos: extracto metanólico, y sus fracciones, acuosa y butanólica de maca roja mediante el estudio histológico renal comparados con el control.

## 5. Metodología

### 5.1. Diseño del estudio:

Estudio experimental en ratas de laboratorio cuya duración fue de 90 días.

### 5.2. Población: ratas de laboratorio de la cepa Sprague-Dawley.

5.3. Muestra: ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 06 semanas de vida. Se obtuvieron del Bioterio del Laboratorio de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Se registraron los pesos al recojo de los animales del Bioterio.

El ambiente en donde se ubicaron a los animales tenía temporizador lo cual permitió controlar el tiempo de luz, siendo 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se mantuvo condiciones de humedad y temperatura standard.

Fueron 24 ratas, distribuidas en cuatro grupos. Cada uno de ellos contaba con seis ratas. Se colocaron en jaulas de polipropileno en grupos de tres. Pasaron por un periodo de adaptación de 1 semana antes del inicio de la administración de las sustancias. Durante este periodo recibieron alimento y agua a voluntad.

Se registró el peso de los animales al inicio de la inoculación (día 1) y con dichos valores se procedió a realizar los cálculos para la elaboración de las dosis a administrar. Semanalmente se registraban los pesos y se procedía al cálculo de dosis a administrar.

#### 5.4 Tamaño muestral:

Con ayuda del programa estadístico Stata v.14, y teniendo como referencia el artículo donde se emplea *Lepidium sativum*, se registraron medias y SEM (error standard) de los volúmenes urinarios obtenidos al consumir extracto metanólico o acuoso. Se obtuvo que el número mínimo de ratas por grupo sea tres, sin embargo por posibilidad de pérdida o muerte de animales se emplearon seis animales por grupo. (26)

#### 5.5. Operacionalización de variables.

##### Identificación de variables

- 5.5.1. Peso de la rata.
- 5.5.2. Peso de los riñones.
- 5.5.3. Hemoglobina
- 5.5.4. Recuento leucocitario
- 5.5.5. Plaquetas
- 5.5.6. Tiempo de protrombina
- 5.5.7. Creatinina sérica
- 5.5.8. Urea sérica
- 5.5.9. Sodio sérico
- 5.5.10. Potasio sérico
- 5.5.11. Calcio sérico
- 5.5.12. Fósforo sérico
- 5.5.13. Magnesio sérico
- 5.5.14. pH urinario

5.5.15. Densidad urinaria

5.5.16. Glucosa en orina

5.5.17. Daño renal por histología

En la presente tabla se consignan las variables de estudio.

<b>Variable</b>	<b>Definición Conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Indicador</b>	<b>Unid. de medida</b>	<b>Escala</b>	<b>Valor referenciales según Wolford (50)</b>
Peso del animal Peso del riñón	Peso del animal o del riñón	Peso registrado con balanza de precisión.	Peso al inicio de la inoculación. (Día1). Peso final. (Día 90) Peso del riñón I y D	G	Razón	
Hemoglobina	Proteína intracelular transportadora de oxígeno	Proteína presente en los glóbulos rojos	Su concentración en sangre es útil para definir anemia	g/dL	Razón	13.4-16
Recuento Leucocitario	Células componentes de la sangre.	Células pieza clave para el sistema inmunológico.	Se encuentran en la sangre y en tejido linfoide.	(cél/ $\mu$ L)	Razón	6-18
Plaquetas	Fragmentos citoplasmáticos derivados de megacariocitos	Fragmentos citoplasmáticos circulantes en sangre involucrados en la hemostasia	Inician la formación de coágulos	( $\times 10^3$ / $\mu$ L)	Razón	788-1241
Creatinina sérica	Metabolito de la creatina, excreción renal.	Niveles de Creatinina en sangre	Concentración sérica de creatinina	mg/dL	Razón	M: 0.7 H:0.6
Sodio sérico	Principal catión del medio extracelular	Niveles de sodio en sangre	Concentración sérica de sodio	mEq/L	Razón	M: 149 H: 149
Potasio Sérico	Principal catión del medio intracelular	Niveles de potasio en sangre	Concentración sérica de potasio	mEq/L	Razón	M:6.8 H: 6.4
Cloro sérico	Catión del medio extracelular	Niveles de cloro en sangre	Concentración sérica de cloro	mEq/L	Razón	M: 104 H: 106

Variable	Definición Conceptual	Definición operacional	Indicador	Unid. de medida	Escala	Valor referenciales según
Fósforo inorgánico	Catión divalente interviene en la generación de energía	Niveles de fósforo inorgánico en sangre	Concentración sérica de fósforo	mg/dL	Razón	M: 8.5 H: 7.3
Calcio sérico	Catión divalente interviene sobre todo de contracción muscular	Niveles de calcio en sangre	Concentración sérica de calcio total	mg/dL	Razón	M: 11.7 H: 11.6
Volumen de orina en 24 horas.	Cantidad de orina recolectada	Volumen de orina obtenida en un periodo	mL	mL	Razón	Aprox 10 ml/24 horas
Glucosa sérica	Monosacárido, fuente primaria de síntesis de energía, presente en suero	Niveles de glucosa en suero	Concentración de glucosa en suero	mg/dL	Razón	M: 117 H: 119
Glucosa en orina	Osmol que no debe observarse en orina	Niveles de glucosa en orina	Concentración Urinaria de glucosa. Tira reactiva	mg/dL	Razón	0 mg/dL
pH orina	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno en la orina	pH urinario determinado por la tira reactiva	Resultado obtenido en tira reactiva	-----	Razón	5-7
Gravedad específica urinaria	Relación entre el peso de los solutos en la orina y el peso del agua	Gravedad específica obtenida por la lectura de la tira reactiva	Resultado obtenido en tira reactiva	-----	Razón	1.022-1.050
Sangre en orina	Eritrocitos presentes en orina	Eritrocitos en orina captada por la tira reactiva	Registro de eritrocitos en orina detectado por tira reactiva	Ery/dL	razón	Negativo
Tiempo de protrombina	Prueba que evalúa la tendencia de la sangre a coagularse	Evalúa la vía extrínseca de la coagulación	Si se altera puede traducir problema hepático	Segundos	Razón	

#### 5.5. 16. Score de daño renal por histología y volumen glomerular:

Se evaluaron los parámetros histológicos de daño renal en las láminas de hematoxilina eosina y en las de tinción PAS (ésta última para evaluación de membrana basal y borde en cepillo de las células tubulares). Se utilizó un microscopio Leica Modelo DM 1000.

Se empleó el score de Zhang que evalúa el componente tubular, intersticial, glomerular vascular con ciertas modificaciones (51). En el componente glomerular se agregó el parámetro engrosamiento de asas capilares y en el componente vascular se agregó los parámetros de necrosis fibrinoide e hipertrofia muscular.

De estar presente algún hallazgo descrito, se graduó la severidad/ extensión de la lesión como: Grado 0: ausente, Grado 1: < 25% Grado 2: 25-50% Grado 3: >50-75%. Grado 4: > 75%. Se completó una ficha individual registrándose los principales parámetros a evaluar. (Tabla N°1)

La revisión de las láminas fue realizada por la investigadora y por un patólogo que desconocía los tratamientos recibidos.

Adicionalmente se realizaron mediciones de dos diámetros de los glomérulos presentes en las láminas de histología empleando el programa Leica Application Suite para Windows. Luego de obtener los diámetros y registrarlos en una base de Excel, se obtuvieron las medias de los diámetros y dichos valores fueron empleados para el cálculo de volumen glomerular según Selmanoglu. (52)

Se obtuvo una media de volumen glomerular para cada animal y estos datos fueron incluidos en la base final para su posterior análisis.

## 5.6. Instrumentos, procedimientos y técnicas

### 5.6.1. Tratamientos:

Según el grupo al que pertenecían, recibieron una de las sustancias que se detallan a continuación:

- a) Agua destilada. Grupo 1
- b) Extracto metanólico de maca roja. Grupo 2
- c) Fracción acuosa de extracto metanólico de maca roja. Grupo 3
- d) Fracción butanólica de extracto metanólico de maca roja. Grupo 4

Los extractos y fracciones se prepararon siguiendo la técnica empleada en el laboratorio de Reproducción de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

### 5.6.2. Cálculo de la dosis de extractos y fracciones de maca.

Los efectos por la administración de *Lepidium meyenii*, se han observado con dosis de 1-2 gr de maca pulverizada /kg de peso. (34,53)

Según el protocolo de la OECD para evaluar posibles efectos tóxicos en roedores por 90 días, se sugiere emplear al menos una dosis de 1gr de la sustancia a evaluar por kilogramo de peso por día. (54)

Como en el presente estudio el extracto base fue el extracto metanólico, la dosis diaria fue de 1g de extracto metanólico de maca roja/kg de peso/día para el grupo 2.

Las fracciones butanólica y acuosa se obtuvieron del extracto metanólico, siendo los porcentajes que se recuperaron de 11% y 89% respectivamente.

Las soluciones se prepararon semanalmente de acuerdo al peso del animal y se almacenaron en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

### 5.6.3 Administración de las sustancias y tiempo de administración.

La administración se realizó por vía orogástrica, con una sonda de inoculación reusable 18G curva de 3 pulgadas de longitud (GloMed, Sherman Oaks CA. USA).

El volumen de la sustancia a administrar fue de 1ml y se realizó por las mañanas (08:00-10:00 hrs) durante 90 días consecutivos.

### 5.6.4 Método de obtención de extracto metanólico y fracciones acuosa y butanólica de maca roja. (C.F.)

Se realizaron los siguientes pasos para la obtención de extracto metanólico de maca roja y de sus fracciones butanólica y acuosa.

Luego de haber sido previamente deshidratados, los hipocótilos de maca roja procedentes del Departamento de Junín fueron pesados y posteriormente pulverizados con ayuda de un molino.

Se realizó una primera maceración, de tal manera que por cada 50gr de maca molida se empleó 100ml de metanol, incorporándose en un frasco de vidrio color ámbar. Para lograr una maceración más rápida, se colocó el frasco en una estufa a 30 a 40°C durante 5 días, agitándose el frasco frecuentemente, cinco o seis veces al día.

Transcurridos 5 ó 10 días de maceración, se realizó el filtrado donde se obtuvo la primera porción de extracto metanólico (MeOH). El volumen obtenido se reservó en un recipiente aparte.

Posteriormente se realizó una segunda maceración con el residuo sólido de la primera maceración, incorporándose metanol conservando la relación  $\frac{1}{2}$  (P/V); se colocó en una estufa a 30 - 40°C durante un día y con agitaciones más espaciadas, tres a cuatro veces al día.

Transcurrido ese tiempo se realizó el segundo filtrado; del que se obtuvo un volumen adicional.

Se juntaron las dos filtraciones de las dos maceraciones previas (274 ml), se colocaron en un balón de 500ml para proceder a la evaporación en el equipo rota vapor.

La temperatura del baño maría fue de 40°C, teniendo presente el punto de ebullición del metanol, que es de 64.7 °C.

Se realizó el proceso de evaporación en el rota vapor y cuando aún quedaba unos 4 ó 5ml de MeOH en el balón, este residuo se colocó en una cápsula para ser secado en la estufa a 40°C.

Al terminar el secado se obtuvo el extracto metanólico de maca roja.

Para preparar las fracciones butanólica y acuosa de maca roja se empleó 10 g. de extracto metanólico para trabajar en un balón de vidrio en forma de pera de 1000ml.

Se agregó 500ml de n-butanol y 500ml de agua destilada, se agitó suavemente hasta homogenizar el extracto metanólico (20 a más agitaciones suaves).

Se dejó reposar para que forme las dos fases: fase acuosa y fase butanólica.

Formadas las fases, se separaron en balones que luego fueron llevados al rotavapor.

Para la fase acuosa se empleó una temperatura de 50 a 55 °C y para la fase butanólica una temperatura de 60 °C. (el punto de ebullición de n- butanol es 117.4 °C)

Al quedar en los balones 4 a 5ml de ambas fases se colocaron en unos frascos de vidrio para realizar su secado en estufa a una temperatura de 60 a 70 °C para obtener la fracción acuosa y la fracción butanólica.

Cada una de las fracciones obtenidas se reservaron en frascos de vidrio, rotulados.

#### 5.6.5 Jaula de polipropileno:

Jaulas rectangulares donde permanecieron los animales durante los periodos en los que no se midió el volumen urinario. Recibieron alimento y agua a voluntad. La limpieza de las jaulas fue interdiaria. Estuvieron distribuidos en grupos de 3 roedores por jaula.

#### 5.6.6 Jaula metabólica:

Las jaulas metabólicas son instrumentos que permiten la recolección individualizada de la orina de un animal de experimentación, habitualmente roedores. Facilitan la separación de las deyecciones sólidas

de la orina. Con el uso de un recipiente (tubo de ensayo o probeta) puede recolectarse la orina por el periodo que se determine. (Fotos N° 1-5)

#### 5.6.7 Evaluación de la diuresis de 24 horas.

Cinco días antes de completar los 90 días de administración de los extractos o fracciones, los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales para que pudiesen adaptarse a dicho ambiente.

- A las 08:00 horas del día 89 de estudio, se inició la recolección de la orina con ayuda de una probeta graduada.
- A las 08:00 horas del día siguiente (día 90) se midió el volumen urinario recolectado en 24 horas.

#### 5.6.8 Obtención de muestras de sangre y sacrificio de los animales.

##### 5.6.8.1. Sedación

Se realizó la sedación del animal antes de la obtención de sangre.

Uso de pentobarbital (Halatal ®)

Este barbitúrico tiene efecto sedante y su metabolismo es principalmente hepático. La dosis utilizada fue de 40 mg/kg por vía intraperitoneal. (55)

5.6.8.2 Técnica de administración intraperitoneal: Sosteniendo a la rata con una de las manos, se introdujo una aguja N° 25G acoplada con una jeringa de 1ml en sentido craneal con ángulo de inclinación de 30-40° a 2.5 cm lateral a la línea media entre el ombligo y el tendón prepúbico derecho.

### 5.6.8.3. Técnica de punción cardiaca

El día 90 de estudio, se anestesió a cada animal por vía intraperitoneal con pentobarbital a dosis de 40 mg/kg, luego de verificar la adecuada sedación del animal y siguiendo la técnica descrita por Barassi y col. que detalla a continuación, se procedió a realizar la punción cardiaca: (56)

Cuando el animal estaba sedado se le ubicó sobre una mesa en posición decúbito dorsal.

- i. Se flexionó la pata izquierda delantera, sobre el mismo lado.
- ii. Se buscó el latido de punta del corazón con el dedo índice.
- iii. Con ayuda de una aguja N°.25G insertada en una jeringa de 5 ó 10ml, se realizó una punción con un ángulo de 45-50° penetrando en la cavidad torácica hasta que se observó sangre en la jeringa.
- iv. Seguidamente se procedió a retirar el émbolo suavemente y se extrajo sangre 5-7 ml, que fue colocada en tubos de ensayo rotulados.
- v. Posteriormente, se sacrificó al animal por dislocación cervical

### 5.6.9. Procesamiento de las muestras de sangre, orina y tejidos.

#### 5.6.9.1. Procesamiento de las muestras de sangre.

Los tubos conteniendo las muestras de sangre se colocaron en una centrífuga.

Se programó la centrífuga a 3000 RPM por 10 minutos.

Transcurrido este tiempo y con ayuda de una micro pipeta se separó el suero el cual se almacenó en tubos Eppendorf.

Los sueros se mantuvieron a -20° hasta el análisis correspondiente.

Las muestras de sangre para estudios bioquímicos y hematológicos fueron procesadas en el Laboratorio Patovet, donde se empleó química líquida con la máquina Metrolab 1600 DR (Wiener lab) para las mediciones bioquímicas séricas a excepción de electrolitos séricos que empleó la máquina Cobas 6000 (Roche Diagnostics).

#### 5.6.10. Procesamiento de muestra de orina

Al término de la recolección de orina de 24 horas se procedió a medir el volumen emitido.

Se obtuvo una alícuota de 5 -10ml para realizar la medición del pH, densidad urinaria y glucosa con una tira reactiva (Medi-Test Combi 10SGL. Macherey –Nagel GmBH&Co)

#### iii. Procesamiento de órganos y tejidos.

Luego de la dislocación cervical, cada animal fue sometido a disección para permitir la extracción de los dos riñones.

Luego de extraerse estos órganos, se colocaron inmediatamente en formol bufferado al 10 % para ser fijados. Se retiró el exceso de grasa peri renal, se secó cada órgano en papel toalla y luego se registró el peso con ayuda de una balanza de precisión de 2 dígitos

(OHAUS. Traveler). Posteriormente los riñones fueron seccionados de manera coronal y se fijaron por 48 horas en formol bufferado.

Transcurrido dicho periodo de tiempo, los riñones fueron colocados en cassettes para realizarse el proceso de coloración, se lavaron con agua destilada para retirar el formol y luego fueron conservados en un frasco conteniendo alcohol etílico a 70° hasta su procesamiento.

Los cassettes fueron procesados para realizar la tinción hematoxilina-eosina (1 lámina por cada riñón) y la tinción PAS. Ambas láminas de 2 µm de grosor. Se hizo el análisis histológico del riñón izquierdo.

Se realizaron observaciones de las láminas a 10X, 40X con un microscopio Leica DM 1000. Se evaluaron: glomérulos, túbulos renales, intersticio y vasos sanguíneos; para graduar el posible daño renal se empleó el Score propuesto por Zhang con las modificaciones previamente descritas. (51)

Adicionalmente se hizo la medición de los glomérulos presentes en cada una de las láminas. Una vez obtenida la media de 2 diámetros glomerulares, se procedió al cálculo del área glomerular aplicando la fórmula empleada por Selmanoglu. (52)

Se promediaron los dos diámetros (d). Luego, dicho valor se incorporó en la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen glomerular} = 4 * \pi (d/2)^3 / 3.$$

Este valor se calculó para cada glomérulo medido.

Para cada lámina histológica perteneciente a un riñón se obtuvo un volumen glomerular promedio. Este valor fue incluido en la base de datos para el análisis.

#### 5.6.9. Destino final de los animales.

Luego de haberse reservado los riñones de cada animal, el remanente fue colocado en una bolsa roja y enviado al área de sustancias contaminadas.

#### 5.7. Consideraciones éticas.

El presente proyecto es parte del proyecto enviado al Comité de Ética previamente: Efecto a largo plazo de los extractos alcaloides y no alcaloides de tres variedades de maca (*Lepidium meyenii*) sobre la función hepática, tiroidea y renal en ratas Holtzman. Código de registro No. 0000064664; El cual fue enviado al Comité de Ética en animales de la UPCH para su aprobación.

Se tomaron en consideración las normas y guías internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio. (57)

#### 5.8. Plan de análisis

Se obtuvo la información requerida y se completó una ficha por cada animal. Luego de obtenida dicha información en la ficha de recolección de datos, se procedió a validarlos con el programa Excel para evaluar errores y defectos.

### 5.9. Análisis estadístico

Se empleó el programa estadístico STATA V.14. Se consideró como significativo el valor de  $P < 0.05$ .

Las variables categóricas se evaluaron con *chi cuadrado exacto* y se compararon usando el test de proporciones.

Para el caso de variables continuas se determinaron la media  $\pm$  Desviación estándar de cada una de ellas:  $X \pm DS$ . Para comparar más de dos medias se usó “ANOVA One-way” para variables con distribución normal y para variables no paramétricas se usó Kruskal Wallis.

### 5.10. Financiamiento

El presente estudio fue financiado por el Círculo de investigación de Plantas con Efecto en Salud- Fondecyt.

## 6. Resultados

Ningún animal murió con las dosis recibidas de extracto metanólico o las fracciones butanólica y acuosa de maca roja antes de los 90 días de seguimiento.

### 6.1 Pesos corporales y peso de riñones.

El peso al momento del recojo de los animales Bioterio fue diferente significativamente entre los grupos ( $P < 0.000$ ) Tabla N°2. Hubo diferencia en los pesos en el día de inicio de la inoculación ( $P = 0.024$ ), sin embargo hacia la cuarta semana del estudio, los pesos de los animales fueron similares entre los grupos hasta el fin del estudio. Tabla N° 3.

La ganancia de peso fue similar entre los grupos. ( $P = 0.54$ ). Tabla N°2.

No se encontraron diferencias en el peso de los riñones tanto derecho como izquierdo entre los grupos ( $P = 0.074$  y  $P = 0.054$  respectivamente). Tabla N°4.

### 6.2 Parámetros hematológicos:

La hemoglobina promedio fue de  $16.25 \text{ g/dL} \pm 1.33 \text{ g/dL}$ , ( $X \pm DS$ ) no se encontró diferencia significativa entre los grupos ( $P = 0.10$ ).

El recuento leucocitario no difirió entre los grupos, se detalla en la Tabla N° 5.

Con respecto al conteo plaquetario se encontró que fue menor en el grupo que recibió fracción butanólica ( $P = 0.01$ ). Tabla N° 5

Se realizó el estudio de Tiempo de protrombina (TP), no encontrándose diferencia entre los grupos ( $P = 0.73$ ). Tabla N° 5

### 6.3 Analítica sérica:

Los valores obtenidos de la bioquímica renal se resumen en la **Tabla N° 6**. Las variables séricas analizadas úrea, creatinina, sodio, potasio, fósforo, magnesio y albúmina no fueron diferentes entre los grupos.

Con respecto a los niveles de calcio sérico total, éstos fueron diferentes entre los grupos control y metanólico, control y butanólico, metanólico y acuoso y entre el acuoso y butanólico (P=0.0004). Gráfico N°1.

Se encontró diferencias significativas en las medias de los valores de glucosa sérica entre el grupo que recibió fracción acuosa comparado con el grupo control y entre el grupo que recibió fracción butanólica comparado con el control (P= 0.0021) Tabla N° 7.

### 6.4 Volumen urinario

Efecto sobre la diuresis.

Con respecto al volumen urinario recolectado durante 24 horas al final del estudio, la media fue de 13.52ml  $\pm$  4.06ml, encontrándose diferencia significativa entre los grupos. (P =0.008). El grupo acuoso registró mayor volumen urinario que el grupo control y que el grupo metanólico (P= 0.028 y P= 0.037 respectivamente). Gráfico N°2.

### 6.5 Resultados del análisis semi cuantitativo de la orina con la tira reactiva.

No se encontraron variaciones en el valor de pH entre los grupos. La gravedad específica fue 1.000, a excepción de 2 casos en los que se obtuvo 1.005. No se registró glucosa en ninguna de las muestras de orina. Trazas de proteínas se

registraron en 3 casos: 1 perteneciente al grupo control, 1 al grupo metanólico y 1 acuoso. Se registró trazas de sangre en la orina en un caso perteneciente al grupo acuoso. Estos hallazgos no tuvieron diferencia significativa entre los grupos. (Tabla N° 8).

#### 6.6 Evaluación histológica.

Con respecto a las láminas histológicas, se completó la ficha de score de daño renal para cada animal, luego de la lectura de la lámina con tinción H-E y PAS. Cuando se hicieron las comparaciones con el test de proporciones no se encontró diferencia significativa entre los grupos. (Tabla N° 9).

Un animal perteneciente al grupo que recibió fracción acuosa presentó pérdida del borde en cepillo, hallazgo observado en necrosis tubular. Se evidenció también en dicho animal un infiltrado inflamatorio escaso, proliferación mesangial e hipertrofia muscular arterial. Otro animal del mismo grupo presentó hipertrofia muscular arterial.

Con la coloración PAS se corroboró la indemnidad de la membrana basal y del borde en cepillo en el resto de las láminas evaluadas.

Para comparar las medias de los volúmenes glomerulares se empleó el Programa Leica Application Suite para Windows, Se siguió el método mencionado por Selmanoglu y col 2011 (52). (Tabla N° 10).

En las fotos N° 6-12 se detalla la histología renal de los cuatro grupos de estudio.

## 7. Discusión.

### 7.1. Pesos corporales y de riñones.

Con respecto al peso al inicio de la inoculación (Día 1), si bien todos los animales tuvieron la misma edad, hubo diferencia estadística entre el grupo que recibió el extracto metanólico y el que recibió la fracción butanólica. Cabe mencionar que no pertenecían a la misma camada y por ello pudo explicarse la diferencia en los pesos.

Todos los animales tenían la misma edad al momento de recogerlos del Bioterio y también cuando comenzó el periodo de inoculación (Día 1), si se hubiera esperado a que el grupo que recibió fracción butanólica ganara más peso antes de iniciar la inoculación, se tendría una variable que lo diferenciaría del resto de grupos y sería la edad, esto tiene relevancia para el estudio dado que las ratas de la cepa Sprague-Dawley tienen un tiempo de vida media de aproximadamente 2 años y se menciona que el proceso de envejecimiento puede ocurrir incluso antes del año de edad. (58) Desde que los animales se recogieron del Bioterio y pasaron por el periodo de adaptación, se observó que se hacían cada vez más homogéneos en el peso. Hacia la primera semana de tratamiento no se observó diferencia en los pesos de los grupos.

Posteriormente sólo se encontró diferencia significativa en la segunda y tercera semana, siendo similares en peso durante el resto de semanas de estudio.

Los extractos o fracciones se administraron según el peso corporal y éste fue cuantificado semanalmente, lo que permitió administrar una cantidad de extracto o fracción utilizada proporcional al peso, durante las 13 semanas.

No se observó diferencias en el peso final entre los grupos. Similar hallazgo fue reportado en estudios previos al administrar extracto acuoso de maca roja, amarilla y negra a ratas macho. (33, 34) A pesar de que las dosis y tipos de extractos administrados en dichos estudios fueron diferentes, en el presente estudio tampoco se encuentran diferencias en el peso final.

Para el presente estudio si bien hubo diferencias en el día 1 de inoculación entre el grupo metanólico y butanólico, ninguno de los pesos se encontraba por debajo del peso promedio para la edad de los animales y en las semanas posteriores (cuarta a décimo tercera) no se evidenció diferencias al comparar los pesos entre los grupos.

Existen investigaciones en modelos animales y en seres humanos que señalan menor número de nefronas en recién nacidos prematuros y de bajo peso, y que ello tiene implicancias pues estarían más predispuestos para desarrollar hipertensión. (59) Otros estudios en modelos animales por el contrario, no evidenciaron variación en el número de nefronas o el volumen glomerular en ratas, ni en la predisposición para desarrollar hipertensión, refiriendo la utilización de técnicas más estandarizadas para las mediciones realizadas. (60, 61)

Es sabido que la formación de nefronas termina a las 34 semanas de gestación en el ser humano, luego ocurre el proceso de maduración funcional de las mismas. (27)

Para el caso de roedores de laboratorio, específicamente ratas, se ha visto que el desarrollo del sistema tubular renal continúa hasta las 2 semanas de nacimiento. (58)

En el presente estudio se emplearon animales de 7 semanas de edad con lo que se aseguró que el desarrollo del sistema tubular fuera completo para posteriormente evaluar la función renal luego de 90 días de administración del extracto o fracciones.

Con respecto al peso de los riñones, en el presente estudio no se encontraron diferencias en el peso del riñón izquierdo ni derecho entre los grupos. En estudios previos en los que se administró maca en extracto acuoso por 34 y 42 días tampoco se encontraron diferencias en el peso de los riñones. (15, 33)

Se ha reportado que el peso de los órganos puede guardar relación con la funcionalidad del mismo pero no sería una condición que necesariamente indique toxicidad. La Sociedad de Patología Toxicológica hace referencia a que, si bien el pesaje de órganos puede ser de utilidad y sugerir ciertos efectos del tratamiento recibido, la información obtenida debe integrarse con los hallazgos histopatológicos y que variaciones en los pesos entre los grupos de estudio en ausencia de una correlación micro o macroscópica deben interpretarse con cautela. (62)

## 7.2. Parámetros hematológicos.

La hemoglobina al final del estudio no fue diferente entre los grupos lo cual, sumado a un recuento leucocitario similar sugiere poca probabilidad que *Lepidium meyenii* genere toxicidad medular.

Existen estudios que han evaluado el efecto tóxico de ciertas brassicáceas como *Lepidium sativum*. Se emplearon tres concentraciones 2%, 10% y 50% Peso/Peso y placebo en ratas por seis semanas. Se encontró elevación de úrea y disminución de hemoglobina y leucocitos con el consumo de *L. sativum* al 50%.

(63) En el presente estudio ni la hemoglobina ni el recuento leucocitario fueron diferentes entre los grupos.

En el recuento plaquetario, se encontró que existía diferencia entre el grupo que recibió fracción acuosa y el que recibió fracción butanólica, encontrándose valores más bajos en este último. Revisando los rangos de referencia del recuento plaquetario normal en ratas, se tiene que según Wolford, la media es de  $1016 \times 10^3/\text{mm}^3$ . Johnson, por el contrario, registra que el rango de normalidad es de  $150-460 \times 10^3/\text{mm}^3$  (51, 64). Según estas referencias, el valor obtenido del recuento plaquetario en el grupo que recibió fracción butanólica sería menor que el valor reportado como normal según Wolford pero es normal según los rangos de Johnson.

El conteo de plaquetas depende de una adecuada función medular, hepática y esplénica. Cuando la filtración glomerular desciende como en la enfermedad renal crónica, la funcionalidad plaquetaria puede disminuir sin alterar el conteo total de las mismas. (28)

En el presente estudio no se evaluó la función plaquetaria, sin embargo no se observó alguna situación de sangrado que pudiera sugerir la presencia de algún disturbio relacionado al conteo plaquetario.

Existen ciertos extractos, como el alcaloide de hojas de *Carica papaya* que ha sido empleado como tratamiento en los casos de trombocitopenia inducida por busulfán. (65)

Por otra parte, se ha encontrado que el extracto rico en polifenoles de *Punica granatum* redujo la agregación plaquetaria, la movilización de calcio, producción

de tromboxano A<sub>2</sub> y la formación de peróxido de hidrógeno, inducido por colágeno y ácido araquidónico en un estudio in vitro. (66)

En un estudio en ratones a los que se les indujo trombocitopenia, los fenómenos de infarto cerebral o trombosis ocurrieron sólo cuando el conteo plaquetario estaba severamente reducido. (67)

Esto sugiere que no sólo es importante el conteo de plaquetas per se, sino también la calidad de las mismas. En el presente estudio se envió muestras de sangre para medición de tiempo de protrombina, no encontrándose diferencia entre los grupos. No se midió tiempo de coagulación ni sangría, dado que no eran parte de los objetivos del estudio.

## 7.2 Parámetros bioquímicos séricos.

No se evidenció diferencia significativa en la filtración glomerular evaluada como concentración de creatinina sérica entre los grupos, lo cual indicaría que tanto el extracto metanólico administrado a 1g/Kg de peso corporal/día como sus fracciones acuosa y butanólica, no se relacionan con reducción de la filtración glomerular, luego de su administración por 90días.

Por el contrario, el consumo de cierta herbolaria china, constituida principalmente por *Caulis aristolochiae manshuriensis* (Guan Mu Tong), con el objetivo de lograr reducción ponderal fue motivo de disfunción renal en Bélgica. Esto ha sido asociado a la presencia de ácido aristolóquico (AA). (68)

Al investigar los hallazgos histopatológicos renales en modelos experimentales en los que se administró AA, se encontró fibrosis intersticial. Estos estudios sugieren una inhibición de la vía de síntesis del ácido araquidónico.

Adicionalmente se ha observado injuria tubular proximal, con la formación de aductos de DNA y AA, disminución de la expresión de megalina e inhibición de la endocitosis de proteínas de bajo peso molecular mediada por receptores. (Lebeau y col 2005). (69)

Tampoco se encontraron diferencias en los niveles de úrea, sodio, potasio, fósforo, magnesio y albúmina sérica entre los grupos. Sin embargo, se encontraron diferencias en la glucosa sérica y en el calcio sérico total.

#### 7.3.1 Glucosa sérica.

En lo referente a la glicemia se encontraron menores niveles de glicemia en los grupos que recibieron fracción acuosa y butanólica con respecto al control. Esta diferencia no se observó con el grupo que recibió extracto metanólico. Una explicación pudiera ser que ciertos metabolitos presentes en el extracto metanólico no son activos cuando se encuentran juntos, sin embargo al ser fraccionados pueden ejercer efectos, como en este caso una menor glicemia.

Se ha reportado previamente reducción de la glicemia en ratas a las que se les había inducido diabetes con estreptozotocina y que recibieron extracto atomizado hidroalcohólico de maca negra a dosis de 50 mg/Kg/día. (70)

En el presente estudio se empleó extracto metanólico de maca roja y sus fracciones acuosa y metanólica. La ausencia de glucosuria evaluada con la tira reactiva de orina aleja la posibilidad de que algún mecanismo tubular renal, esté implicado en los menores niveles de glicemia en los grupos acuoso y butanólico.

### 7.3.2 Calcio sérico total

Al comparar los niveles de calcio sérico total entre los grupos, se encontró que hubo diferencia entre los grupos, siendo menor en el grupo que recibió extracto metanólico y fracción butanólica comparados con el control. La homeostasis del calcio se lleva a cabo a través del adecuado funcionamiento de aparato digestivo y de los riñones. (71)

Es esperable encontrar reducción de la calcemia cuando existe disfunción renal, por reducción en la actividad de la vitamina D y de Klotho, responsables del reabsorción renal de calcio. (28) Sin embargo, ésta no sería la explicación para el presente estudio porque no hubo diferencia significativa en los valores de creatinina sérica entre los grupos. Lo importante es que los valores se encuentran dentro de los parámetros normales. Se sabe que maca roja mejora la masa ósea en ratas ovariectomizadas y ello puede implicar un mayor uso del calcio sérico. (72) A raíz de los resultados del presente trabajo serán necesarios mayores estudios para evaluar la homeostasis del calcio frente al uso crónico de maca.

Algunas alteraciones tubulares renales pueden acompañarse de hipocalcemia o hipercalcemia, pero por lo general están acompañados de otros disturbios electrolíticos como hipomagnesemia o hiperfosfatemia o hipofosfatemia, (73) No se evidenció hipomagnesemia ni alteraciones en el fósforo sérico en ninguno de los grupos estudiados. (74) Ni el grupo que recibió extracto metanólico ni el butanólico tuvieron valores diferentes en el resto de electrolitos séricos evaluados. Ello sugiere algún mecanismo no renal posiblemente involucrado en los hallazgos relacionados con la calcemia.

#### 7.4. Volumen urinario

Con respecto al efecto en el volumen urinario, se pudo evidenciar diferencias entre el grupo control y el que recibió fracción acuosa siendo mayor en este último. Se ha reportado que otras especies de *Lepidium*, como por ejemplo *L. sativum* y *L. latifolium* tienen efectos diuréticos en modelos animales que recibieron extracto acuoso o metanólico. (25, 26) En el presente estudio no se evaluó efecto agudo en la diuresis, sino el efecto a mediano plazo.

Entre otros metabolitos que estarían involucrados en el aumento de la diuresis se ha sugerido isoquercitrina, flavonoides, saponinas, entre otros. (75, 76) En estudios previos sobre maca se ha podido identificar algunos de estos compuestos como polifenoles, entre ellos flavonoides como la quercetina. (16) Esta última al unirse con el desoxi azúcar ramnosa forma la isoquercitrina. Se ha detectado la presencia de polifenoles en mayor proporción en las fracciones acuosas de maca. (Inoue y col 2016). (24)

Para el presente estudio se encontró mayor cantidad de polifenoles en el grupo que recibió extracto metanólico (9.28g de ácido gálico/100gr de extracto), en menor proporción en el grupo acuoso (0.5g de ácido gálico/100g de fracción) y en escasa proporción en el grupo que recibió fracción butanólica (0.01g de ácido gálico/100g de fracción).

Se observó que precisamente en el grupo con mayor diuresis, los niveles de calcio sérico total fueron más elevados comparados con el grupo que recibió fracción butanólica. La hipercalcemia conlleva a un incremento de volumen urinario por efecto de inhibición de expresión de aquaporinas-2 a nivel tubular distal. (77, 78)

#### 7.5. Tira reactiva de orina.

Los estudios realizados con la tira reactiva fueron semicuantitativos, en ellos no se encontró diferencia con el test de proporciones en lo referente a pH, densidad urinaria o sangre.

Tampoco se encontró glucosuria en ninguno de los grupos, lo cual sugiere que, de haber cierto efecto en la glicemia, algún mecanismo no relacionado con la excreción de glucosa por vía urinaria podría estar involucrado.

Los hallazgos de proteínas en orina en algunos animales no llegan a tener relevancia estadística según el test de proporciones.

#### 7.6. Histología renal:

Se evaluaron los parámetros histológicos contenidos en la tabla No 1 para estudiar los componentes: glomerular, tubular, intersticial y vascular.

Pese a que se encontró un caso de necrosis tubular en el grupo acuoso, al realizar el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa entre los grupos.

Dado que los hallazgos de necrosis tubular, infiltrado inflamatorio estuvieran en un solo animal, sería probable que haya presentado alguna condición no estudiada.

Con respecto al estudio histomorfométrico de volúmenes glomerulares, no se encontraron diferencias entre los grupos, lo cual guarda relación con los hallazgos de creatinina sérica, cuyo valor fue similar para los cuatro grupos.

En un estudio de toxicidad con extracto acuoso de *Senecio candicans DC* se observaron como hallazgos daño renal en ratas Wistar; a pesar de que los registros de peso fueron similares entre los grupos control y tratados. A una dosis de 750mg/kg se evidenciaron cambios histológicos como fibrosis focal

intersticial, cambios hidr6picos con glom6rulos hipercelulares. Adicionalmente se evidenci6 elevaci6n significativa de creatinina:  $0.28 \pm 0.04$  mg/dL vs  $0.81 \pm 0.05$  mg/dL. (79)

Otros tipos de extracto como el metan6lico de hojas de *Vernonia bipontini* gener6 nefrotoxicidad en ratones demostrada como elevaci6n de creatinina s6rica y . (80)

En el presente estudio se emplearon los hipoc6tilos de maca roja, de los que se obtuvo extracto metan6lico y posteriormente las fracciones acuosa y butan6lica.

#### 7.7. Fortalezas del estudio

Con respecto a las fortalezas del estudio se debe mencionar que pese a la informaci6n brindada por Piacente (21), estudio en el que se alerta sobre los riesgos al consumir la fracci6n butan6lica de maca, en el presente estudio, en el que se administr6 extracto metan6lico o fracciones acuosa o butan6lica de maca roja por 90 d6as consecutivos, no se encontraron hallazgos a nivel renal que sugieran alg6n da6o t6xico, ni se produjo la muerte de los animales de experimentaci6n antes de completar el periodo de seguimiento.

Si bien se encontraron diferencias en el conteo de plaquetas, glicemia y calcemia, estas variables no dependen exclusivamente de la funci6n renal.

#### 7.8. Limitaciones del estudio

Entre las debilidades del estudio, debe mencionarse en el d6a 1 de administraci6n del extracto o de las fracciones hubo diferencia estad6stica entre los grupos, sin embargo esta diferencia en los pesos se mantiene hasta la tercera semana, en adelante los pesos se hacen similares hasta el final del estudio.

Para el presente estudio se empleó un fenotipo y una dosis, podría existir un efecto diferenciado según la variedad de maca, esto no ha sido evaluado.

No se hicieron estudios complementarios sobre el metabolismo del calcio: vitamina D, Paratohormona intacta, calcio iónico, calcio en orina, creatinina en orina, los cuales serian útiles para esclarecer los hallazgos sobre la calcemia.

## 8. Conclusiones

Con la dosis de 1 gramo de extracto metanólico de maca roja por kilo de peso y de sus fracciones acuosa y butanólica administradas por vía orogástrica por 90 días a ratas macho Sprague-Dawley no se observaron diferencias en la filtración glomerular, hubieron menores niveles de calcio sérico total en los grupos metanólico y butanólico y un volumen urinario mayor en el grupo que recibió fracción acuosa.

No se mostraron alteraciones histológicas que sugieran toxicidad por el consumo de extracto metanólico y las fracciones acuosa y butanólica de maca roja por 90 días de consumo en este modelo murino. Hubo un caso de necrosis tubular en el grupo que recibió fracción acuosa.

## 9. Recomendaciones

Se sugiere hacer estudios que permitan evaluar el efecto agudo en la diuresis considerando la dosis recibida, el tipo de extracto o fracción de *Lepidium meyenii* y el fenotipo empleado.

Debido al hallazgo de diferencias en los niveles de calcio, se hacen necesarios estudios futuros que evalúen niveles de hormonas y vitaminas implicadas en la homeostasis del calcio, así como la medición de calcio iónico en sangre.

De reproducirse resultados similares a los encontrados en el presente estudio, serían de utilidad la inclusión de modelos animales donde se evidencien patologías relacionadas con el metabolismo del calcio como nefrolitiasis, osteoporosis o enfermedad mineral ósea en la enfermedad renal crónica.

## 10. Referencias Bibliográficas

1. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005.  
[Internet]. Geneve: World Health Organization. [2002; citado 1 mar 2017].  
Disponible en: [http://www.wpro.who.int/health-technology/book\\_who\\_traditional\\_medicine-strategy\\_2002-2005.pdf](http://www.wpro.who.int/health-technology/book_who_traditional_medicine-strategy_2002-2005.pdf).
2. Gonzales GF, Gonzales C, Gonzales-Castañeda C. *Lepidium meyenii* (Maca): a plant from the highlands of Peru—from tradition to science. *Forsch Komplementmed*. 2009;16(6):373-80.
3. de Oliveira RB, de Paula DA, Rocha BA, Franco JJ, Gobbo-Neto L, Uyemura SA, et al. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: the yacon example. *J Ethnopharmacol*. 2011; 27:133(2):434-41.
4. Kim YJ, Choi MS, Park YB, Kim SR, Lee MK, Jung UJ. *Garcinia Cambogia* attenuates diet-induced adiposity but exacerbates hepatic collagen accumulation and inflammation. *World J Gastroenterol*. 2013;19(29):4689-701.
5. Gonzales GF. Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012:1-10.
6. Zheng BL, He K, Kim CH, Rogers L, Shao Y, Huang ZY, Lu Y, Yan SJ, Qien LC, Zheng QY. Effect of a lipidic extract from *lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats. *Urology*. 2000; 55(4):598-602.

7. Cicero AF, Bandieri E, Arletti R. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behaviour in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. *J Ethnopharmacol.* 2001;75(2-3):225-9.
8. Cicero AF, Piacente S, Plaza A, Sala E, Arletti R, Pizza C. Hexanic Maca extract improves rat sexual performance more effectively than methanolic and chloroformic Maca extracts. *Andrologia.* 2002;34(3):177-9.
9. Yucra S, Gasco M, Rubio J, Nieto J, Gonzales GF. Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular functions in adult male rats. *Fertil Steril.* 2008; 89(5 Suppl):1461-7.
10. Gonzales GF, Nieto J, Rubio J. Gasco M. Effect of Black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. *Andrologia.* 2006;38: 166-172.
11. Rubio J, Caldas M, Dávila S, Gasco M, Gonzales GF. Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (Maca) on learning and depression in ovariectomized mice. *BMC Complement Altern Med.* 2006; 6:23.
12. Vecera R, Orolin J, Skottová N, Kazdová L, Oliyarnik O, Ulrichová J et al. The influence of maca (*Lepidium meyenii*) on antioxidant status, lipid and glucose metabolism in rat. *Plant Foods Hum Nutr.* 2007;62(2):59-63.
13. Del Valle J, Pumarola T, Alzamora L, Del Valle L. Antiviral activity of maca (*Lepidium meyenii*) against human influenza virus. *Asian Pac J Trop Med.* 2014; 7(Suppl 1): 415-420.

14. Gonzales GF, Cordova A, Gonzales C, Chung A, Vega K, Villena A. *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian J Androl.* 2001;3(4):301-3.
15. Gonzales GF. *Maca de la Tradición a la Ciencia.* Lima: UPCH-Concytec; 2006.
16. Lee MS, Lee HW, You S, Ha KT. The use of maca (*Lepidium meyenii*) to improve semen quality: A systematic review. *Maturitas.* 2016;92:64-9.
17. Stojanovska L, Law C, Lai B, Chung T, Nelson K, Day S et al. Maca reduces blood pressure and depression, in a pilot study in postmenopausal women. *Climateric.* 2015;18(1):69-78.
18. Dini A, Migliuolo G, Rastrelli L, Saturnino P, Schettino O. Chemical composition of *Lepidium Meyenii*. *Food Chemistry.* 1994; 49:347-349.
19. Dini, I, Tenore, G, Dini, A. Glucosinolates from Maca (*Lepidium meyenii*). *Biochemical Systematics and Ecology.* 2002; 30:1087–1090.
20. Zhao J, Muhammad I, Dunbar DC, Mustafa J, Khan IA. New alkalamides from maca (*Lepidium meyenii*). *J Agric Food Chem.* 2005;53(3):690-3.
21. Piacente S, Carbone V, Plaza A, Zampelli A, Pizza C. Investigation of the tuber constituents of maca (*Lepidium meyenii* Walp.) *J Agric Food Chem.* 2002;25(50):5621-5.
22. Bai N, He K, Roller M, Lai CS, Bai L, Pan MH. Flavonolignans and other constituents from *Lepidium meyenii* with activities in anti-inflammation and human cancer cell lines. *J Agric Food Chem.* 2015;63(9): 2458-63.
23. Hirsh M. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du risque pour la santé du consommateur de l'emploi de la poudre de racine de maca, commercialisée telle quelle ou entrant

- dans la composition de compléments alimentaires. [Internet]. Maisons-Alfort : Agence Française de sécurité Sanitaire des Aliment ; 2004. [2004 ; citado 1 mar 2017]. Disponible en : <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2004sa0155.pdf>.
24. Gonzales GF, Gonzales-Castañeda C. The Methytetrahydro- $\beta$ -Carbolines in Maca (*Lepidium meyenii*) Evid Based Complement Alterna Med, 2009; 6(3):315-6.
  25. Inoue N, Farfan C, Gonzales GF. Effect of butanolic fraction of yellow and black maca (*Lepidium meyenii*) on the sperm count of adult mice. *Andrologia*. 2016; 48: 915-921.
  26. Patel U, Kulkarni M, Undale V, Bhosale A. Evaluation of Diuretic Acitivity of Aqueous and mathanol extracts of *Lepidium sativum* Garden Cress (Crucifere) in Rars. *Trop J Pharm Res*. 2009; 8(3): 215.
  27. Navarro E, Alonso J, Rodriguez R, Trujillo J, Boada J. Diuretic action of an aqueous extract of *Lepidium latifolium* L. *J Etnopharm*. 1994; 41:65-69.
  28. Brenner B. Brenner and Rector's The Kidney. 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
  29. Basile D., Anderson M., Sutton T. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Compr Physiol*. 2012; 2(2): 1303-1353.
  30. Organización Mundial de la Salud. Medicina Tradicional. 56<sup>a</sup> Asamblea Mundial de la Salud. [Internet]. Ginebra: OMS; 2003. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/80225/1/sa56r31.pdf>.
  31. Hermann M, Bernet T. The transition of maca from neglect to market prominence: lessons for improving use strategies and market chains of

- minor crops.[Internet]. Rome: Biodiversity International; 2009. [citado 1 mar 2017]. Disponible en: <http://www.biodiversityinternational.org/e-library/publications/>.
32. Valerio L, Gonzales GF. Toxicological Aspects of the South American Herbs Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*). *Tox Review*. 2005; 24(1) :11-35.
  33. Gonzales C, Rubio J, Gasco M, Nieto J, Yucra S, Gonzales GF. Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats. *J Ethnopharmacol*. 2006;103(3):448-54.
  34. Gasco M, Gonzales G. Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. *Andrologia*. 2007;35: 151-158.
  35. Gorriti A, Arroyo J, Quispe F, Cisneros B, Condorhuamán M, Almora Y, et al. Oral toxicity at 60-days of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) and linseed (*Linum usitatissimum* L.), and determination of lethal dose 50 in rodents. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2010; 27(3):352-60.
  36. Canales M. Aguilar J., Marcelo A., Prada A, Huaman A., Carbajal L. Evaluación nutricional de *Lepidium meyenii* (maca) en ratones albinos y su descendencia. *Arch Latinoam Nutr*. 2000; 2(30): 126-133.
  37. Zha S, Zhao Q, Chen J, Wang L, Zhang G, Zhang H, et al. Extraction, purification and antioxidant activities of the polysaccharides from maca (*Lepidium meyenii*). *Carbohydr Polym*. 2014;111: 584-587.

38. Bai N, He K, Roller M, Lai CS, Bai L, Pan MH. Flavonolignans and other constituents from *Lepidium meyenii* with activities in anti-inflammation and human cancer cell lines. *J Agric Food Chem*. 2015; 63(9):2458-63.
39. Gonzales GF, Valerio L. Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2006 Sep; 6(5):429-44.
40. Kristensen M , Frederiksen H, Bügel SH, Rasmussen SE. Urinary excretion of total isothiocyanates from cruciferous vegetables shows high dose-response relationship and may be a useful biomarker for isothiocyanate exposure. *Eur J Nutr*. 2007;46(7):377-82.
41. Herraiz T, Ough C. Chemical and technological factors determining tetrahydro-beta.-carboline-3-carboxylic acid content in fermented alcoholic beverages. *J. Agric Food Chem*. 1993; 41 (6):959–964.
42. Ichikawa M, Ryu K, Yoshida J, Ide N, Yoshida S, Sasaoka T, et al. Antioxidative effects of tetrahydro-beta-carbolin derivatives identified in aged garlic extract. *Biofactors*. 2002; 16(3-4):57-62.
43. Ichikawa M, Yoshida J, Ide N, Sasaoka T, Yamaguchi H, Onoy KI. Tetrahydro-b-Carboline Derivatives in Aged Garlic Extract Show Antioxidant Properties. *J Nutr*. 2006; 136:726-731.
44. Chaupis-Meza D, Rojas J, Gasco M, Gonzales GF. Efecto hipotensor del extracto de ajo (*Allium sativum*) macerado por 18 semanas en un modelo experimental *in vivo*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014; 31(3):461-66.

45. Ogawa Y, Adachi J, Tatsuno Y. Accumulation of 1-methyl-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid in blood and organs of rat. A possible causative substance of eosinophilia-myalgia syndrome associated with ingestion of L-tryptophan. *Arch Toxicol.* 1993; 67(4):290-3.
46. Eddouks M, Maghrani M, Effect of *Lepidium sativum* L. on renal glucose reabsorption and urinary TGF-beta 1 levels in diabetes rats. *Phytother Res.* 2008; 22(1):1-5.
47. Yadav Y, Srivastav D, Seth AK, Vipin S, Balaraman R, Tejas K. In vivo antioxidant potential of *lepidium sativum* l. Seeds in albino rats using cisplatin induced nephrotoxicity. *Int J Phytomed.* 2010; 292-298.
48. Galvez L, Kwon J, Apostolidis E, Shetty K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioreosource Technol* 2010; 101: 4676-4689.
49. Clément C, Diaz Grados DA, Avula B, Khan IA, Mayer AC, Ponce Aguirre DD, et al. Influence of colour type and previous cultivation on secondary metabolites in hypocotyls and leaves of maca (*Lepidium meyenii* Walpers). *J Sci Food Agric.* 2010; 90(5):861-9.
50. Wolford ST, Schroer RA, Gohs T, Gallo PP, Brodeck M, et al. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environm Health.* 1986; 18: 161-88.
51. Zhang J, Goering PL, Espandiari P, Shaw M, Bonventre JV, Vaidya VS, et al. Differences in immunolocalization of Kim-1, RPA-1, and RPA-2 in

- kidneys of gentamicin-, cisplatin-, and valproic acid-treated rats: potential role of iNOS and nitrotyrosine. *Toxicol Pathol.* 2009; 37(5):629-43.
52. Selmanoglu G., Karacaoglu E., Kilic A., Kopckaya A., Akay T. Toxicity of Food Contaminant Furan on Liver and Kidney of Growing Male Rats. *Environ Toxicol* 2011; (10):613-622.
53. Chung F, Rubio J, Gonzales C, Gasco M, Gonzales GF. Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. *J Ethnopharmacol.* 2005; 98(1):143-7.
54. OECD. Test No. 408: Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents. [Internet] En: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4: Health Effects. OECD Publishing (Paris); 1988. [actualizado 21set 1988; citado 1 mar 2017]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1787/9789264070707-en>.
55. Turner P, Brabb T, Pekow C, Vasbinder M. Administration of Substances to Laboratory Animals. Routes of Administration and Factors to Consider. *J Am Asoc Lab Anim Sci.* 2011;50: 600-613.
56. Barassi N, Sidi M. ABC en Animales de Laboratorio. Primera Edición. Buenos Aires: Hemisferio Sur; 2011.
57. Olfert E, Cross B, McWilliam A. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. [Internet]. Volumen 1, Segunda Edición. Ottawa: Consejo Canadiense de Protección de Animales; 1998. [1988; citado 1 mar 2017]. Disponible en: [http://www.ccac.ca/en/\\_/standards/guidelines/additional/guide-voll](http://www.ccac.ca/en/_/standards/guidelines/additional/guide-voll).

58. Suckow M, Weisbroth S, Franklin C. The Laboratory Rat. American Society of Laboratory. 2<sup>nd</sup> edition. Oxford: Elsevier; 2006.
59. Luyckx V, Brenner B. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney International*. 2005; 68: S68-S77.
60. Jones S, Nyengaard J, Flyvbjerg A, Bilous R, Marshall S. Birth weight has no influence on glomerular number and volume. *Pediatr Nephrol*. 2001; 16:340-345.
61. Zimanyi M, Bertram J, Black J. Does a Nephron deficit in Rats Predispose to Salt-Sensitive Hypertension?. *Kidney Blood Press Res*. 2004; 27:239-247.
62. Sellers R, Morton D, Michael B, Roome N, Johnson J, Yano B, et al. Society of Toxicological Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. *Toxicologic Pathology*. 2007; 35: 751-755.
63. Adam S. Effects of various levels of dietary *Lepidium sativum* seeds in rats. *Am J Chin Med*. 1999; 27: 397-405.
64. Johnson-Delaney C. Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians. (2<sup>nd</sup> ed.) Lake Worth (FL): Zoological Education Network; 1996.
65. Zunjar V, Dash R, Jivrajani M, Trivedi B, Nivsarkar M. Antithrombocytopenic activity of carpaine and alkaloidal extract of *Carica papaya* Linn. leaves in busulfan induced thrombocytopenic Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacol*. 2016;18:20–25.

66. Mattiello T, Trifirò E, Jotti GS, Pulcinelli FM. Effects of pomegranate juice and extract polyphenols on platelet function. *J Med Food*. 2009;12(2):334-339.
67. Moroswki M., Vögtle T., T, Kraft P., Kleinschnitz C, Stoll G., Nieswandt B. Only severe thrombocytopenia results in bleeding and defective thrombus formation in mice. *Blood* 2013;121:4938-4947.
68. Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, Abramowicz D, Dratwa M, Jadoul M, et al. Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs. *Lancet* 1993; 341: 387–391.
69. Lebeau C, Debelle F, Arlt V, Pozdzik A, De Prez E, Phillips D, et al. Early proximal tubule injury in experimental aristolochic acid nephropathy: functional and histological studies *Neprol Dial Trasplant*. 2005;20: 2321–2332.
70. Maldonado C. Efecto del tratamiento con tres dosis de maca negra y metformina en ratas machos con diabetes inducida con nicotinamida-estreptozotocina. [Tesis de Licenciatura en Biología] Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia ; 2015.
71. Blaine J, Chonchol M, Levi M. Renal control of calcium, phosphate, and magnesium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(7):1257-72.
72. Gonzales C, Cárdenas-Valencia I, Leiva-Revilla J, Anza-Ramirez C, Rubio J, Gonzales GF. Effects of different varieties of Maca (*Lepidium*

- meyenii) on bone structure in ovariectomized rats. *Forsch Komplementmed.* 2010;17(3):137-43.
73. Skalova, Konrad M, Kutilek S. Three Different Causes of Hypercalciuria. *Klin Padiatr.* 2011;223:287-289.
74. Ortega B, MacWilliams JR, Dey JM, Courtright VB. Hyperphosphatemia, hypocalcemia and increased serum potassium concentration as distinctive features of early hypomagnesemia in magnesium-deprived mice. *Magnes Res.* 2015; 28(4):126-35.
75. Gasparotto Junior A, Prando TB, Leme Tdos S, Gasparotto FM, Lourenço EL, Rattmann YD, Da Silva-Santos JE, Kassuya CA, Marques MC. Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin. *J Ethnopharmacol.* 2012;141(1):501-9.
76. Jouad H, Lacaille-Dubois MA, Lyoussi B, Eddouks M. Effects of the flavonoids extracted from *Spergularia purpurea* Pers. on arterial blood pressure and renal function in normal and hypertensive rats. *J Ethnopharmacol.* 2001;76(2):159-63.
77. Goldfarb S, Agus ZS. Mechanism of the polyuria of hypercalcemia. *Am J Nephrol.* 1984;4(2):69-76.
78. Earm JH, Christensen BM, Frøkiaer J, Marples D, Han JS, Knepper MA, Nielsen S. Decreased aquaporin-2 expression and apical plasma membrane delivery in kidney collecting ducts of polyuric hypercalcemic rats. *J Am Soc Nephrol.* 1998; 9(12):2181-93.

79. Kuppamuthu K, Nanjian R, Sabaratam V, Naidu M. Aqueous extract of *Senecio candicans* DC induce liver and kidney damage in a sub-chronic oral toxicity study in Wistar rats. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;79:25-34.
80. Mebratu A, Kinfu Y, Makonnen E, Bekuretsi Y, Urga K, Afework M. Toxicological evaluation of methanol leaves extract of *Vernonia bipontini* Vatke in blood, liver and kidney tissues of mice. *African Health Sciences* 2014;14 (4):2012-2024.

11. Anexos  
11.1 Tablas

Tabla No. 1: Score de daño renal.

<b>CÓDIGO</b>					
<b>PARAMETROS</b>					
<b>TÚBULOS</b>					
<b>Degeneración</b>	Ausente	Presente			
<b>Dilatación</b>	Ausente	Presente			
<b>Cilindros</b>	Ausente	Presente	Tipo		
<b>Regeneración</b>	Grado 0: ausente	Grado 1(<25%)	Grado 2(25-50%)	Grado 3(50-75%)	Grado 4(>75%)
<b>Necrosis</b>	Grado 0: ausente	Grado 1(<25%)	Grado 2(25-50%)	Grado 3(50-75%)	Grado 4(>75%)
<b>GLOMÉRULO</b>					
<b>Proliferación mesangial</b>	Grado 0: ausente	Grado 1(<25%)	Grado 2(25-50%)	Grado 3(50-75%)	Grado 4(>75%)
<b>Proliferación celular</b>	Grado 0: ausente	Grado 1(<25%)	Grado 2(25-50%)	Grado 3(50-75%)	Grado 4(>75%)
<b>Vacuolización</b>	Ausente	Presente			
<b>Engrosamiento de asas capilares</b>	Ausente	Presente			
<b>VASOS</b>					
<b>Hialinización</b>	Ausente	Presente			
<b>Necrosis fibrinoide</b>	Ausente	Presente			
<b>Hipertrofia muscular</b>	Ausente	Presente			
<b>INTERSTICIO</b>					
<b>Inflamación</b>	Ausente	Presente			
<b>Distribución</b>	Focal	Difusa			
<b>Extensión</b>	Grado 0: ausente	Grado 1(<25%)	Grado 2(25-50%)	Grado 3(50-75%)	Grado 4(>75%)
<b>Componente</b>	Neutrofilico	Linfoplasmocitario			
<b>Fibrosis</b>	Grado 0: ausente	Grado 1(<25%)	Grado 2(25-50%)	Grado 3(50-75%)	Grado 4(>75%)

**Tabla N°. 2 Pesos inicial, final, ganancia de peso**

	G. control	G. Metanólico	G. Acuoso	G. Butanólico	P
	X ± DS	X ± DS	X ± DS	X ± DS	
Peso al recojo (g)	136.00 ±11.26	106.00 ± 5.79	113.83 ± 7.19	119.83 ± 5.19	<b>&lt;0.001a</b>
P. Adaptación (g)	148.00 ±10.42	146.33 ± 9.66	125.83 ± 6.08	139.33 ± 7.63	<b>0.0008b</b>
P. Día1 (g) (Inicial)	168.18 ± 12.83	155.55 ± 10.86	165.16 ± 5.91	174.50 ± 8.06	<b>0.024c</b>
P. Día90(g) (Final)	318.33 ± 26.45	313.33 ± 20.03	329.16 ±11.85	336.33 ±10.26	0.157
Ganancia de peso (g)	150,14±20,99	157,77±20,36	164,00±12.0	161,83±14,04	0.540

a : Entre grupo control y grupo acuoso: P <0.001, entre grupo control y grupo metanólico P<0.001, entre grupo control y grupo butanólico P=0.01, entre grupo metanólico y grupo butanólico P= 0.039.

b:Ente grupo control y grupo acuoso P<0.001, entre grupo acuoso y grupo metanólico P=0.001, entre grupo acuoso y grupo butanólico P=0.003.

c: Entre el grupo metanólico y el butanólico P=0.019.

**Tabla N°. 3. Pesos semanales según grupos**

	Gr. control	Gr. metanólico	Gr. acuoso	Gr. butanólico	P
	X ± DS	X ± DS	X ± DS	X ± DS	
Semana 1	202.33 ± 15.48	202.00 ± 15.13	193.33 ± 6.74	197.50 ±25.33	0.771
Semana 2	244.50 ± 43.81	227.83 ± 13.73	209.83 ± 7.57	208.16 ± 7.08	<b>0.046a</b>
Semana 3	276.41 ± 35.80	253.66 ± 19.96	232.16 ± 7.75	251.83 ± 9.41	<b>0.017a</b>
Semana 4	290.66 ± 39.35	278.33 ± 19.25	272.83 ± 7.93	269.33 ±10.61	0.412
Semana 5	295.66 ± 39.16	288.33 ± 19.10	288.83 ± 7.25	288.83 ±11.63	0.933
Semana 6	299.00 ± 36.02	298.00 ± 20.49	300.50 ± 4.92	302.66 ±10.63	0.983
Semana 7	300.33 ± 33.93	300.66 ± 22.54	308.16 ± 4.95	326.00 ±11.22	0.159
Semana 8	313.00 ± 33.78	313.33 ± 19.10	320.33 ± 10.51	344.50 ±10.03	0.050
Semana 9	336.50 ± 34.74	324.16 ± 16.52	337.50 ± 12.34	356.00 ± 9.35	0.097
Semana 10	344.66 ± 31.77	334.33 ± 21.80	362.00 ± 10.52	363.16 ±10.83	0.070
Semana 11	353.00 ± 31.73	347.00 ± 27.01	369.83 ± 11.78	377.83 ± 9.32	0.087
Semana 12	363.33 ± 32.37	352.16 ± 27.33	378.00 ± 11.81	383.50 ±11.11	0.102

a: Entre grupo control y butanólico P=0.08. b: Entre grupo control y acuoso P=0.011

**Tabla N°. 4. Pesos de riñones izquierdo y derecho**

	Gr. control X ± DS	Gr. metanólico X ± DS	Gr. acuoso X ± DS	Gr. butanólico X ± DS	P
P. Riñón D (g)	1,03±0,02	0,90±0,08	0,96±0,06	1,02±0,07	0,054
P. Riñón I (g)	0,99± 0,06	0,90± 0,059	0,97± 0,052	0,99±0,43	0,074

P: NS

**Tabla N°5. Hemoglobina, recuento leucocitario y de plaquetas.**

	G. control X ± DS	G. Metanólico X ± DS	G. Acuoso X ± DS	G. Butanólico X ± DS	P
Hb final (g/dL)	17,15±1,86	15,41±1,08	16,6±0,81	15,86±0,85	0,10
Leucocitos (cél/μL)	6780 ± 1514,57	5300 ± 1963,67	6966,66 ± 1941,82	8420 ± 1070,98	0,056
Neutrófilos (cél/μL)	3042,4 ± 1235,43	2752,5 ± 840,92	4196,66 ± 2389,66	3606,66 ± 1757,54	0,57
Linfocitos (cél/μL)	4193,66 ± 1198,83	3035 ± 1082,89	2653,33 ± 757,03	4304 ± 2919,11	0,25
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)	506±432,90	895±59,16	960±148,54	382±145,67	0,01a
TP(seg)	17,76 ±4,3	16,85±0,71	17,71±0,67	17,73±0,55	0,73

a: entre acuoso y butanólico (P=0.02)

**Tabla N° 6. Pruebas bioquímicas séricas para la evaluación de la función renal**

	Gr. control	Gr. metanólico	Gr. acuoso	Gr. butanólico	P
	X + DS	X + DS	X + DS	X + DS	
Urea (mg/dL)	32 ± 8,57	36,5±3,61	39,5 ±7,41	38,75 ± 5,56	0,29
Cr. (mg/dL)	0,66 ±0,08	0,64 ±0,10	0,77 ±0,13	0,76 ± 0,14	0,16
Na + (mmol/L)	147,05 ±1,54	147,01±2,00	147,61 ±2,66	146,1±2,04	0,6
K+ (mmol/L)	4,86 ± 0,66	5,08 ±0,82	4,59 ±0,82	4,87 ±0,59	0,72
Cl - (mmol/L)	101,88 ± 2,03	99,36 ±2,50	101,65 ± 0,17	99,85 ±1,37	0,08
Mg 2+(mg/dL)	2,58 ± 0,27	3,14±0,13	2,85 ±0,29	2,90 ±0,50	0,05
P (mg/dL)	5,74 ± 0,22	5,79 ±0,82	6,74 ±0,48	7,04 ±1,73	0,08
Ca 2+ (mg/dL)	15,00 ±2,36	10,66±0,87	16,33 ±1,36	11,18 ±3,36	0,0004 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> P= 0.017 grupo control vs metanólico, P= 0.04 grupo control vs butanólico . P= 0.002

grupo metanólico vs acuoso. P= 0.004 grupo acuoso vs butanólico.

**Tabla N°. 7 Otras pruebas bioquímicas séricas**

	Gr. control	Gr. metanólico	Gr. acuoso	Gr. butanólico	P
	X ± DS	X ± DS	X ± DS	X ± DS	
Glucosa (mg/dl)	120,33 ± 15,47	98,8± 32,88	65,6 ± 15,72	76,83 ± 18,12	0,0021
P.totales (g/dL)	6,15 ± 0,60	6,25 ±0,75	5,7 ± 0,28	6,36± 0,70	0,36
Albúmina (g/dL)	3,11 ±0,67	2,83 ±0,55	2,86±0,39	2,91±0,33	0,77

Entre el grupo control y acuoso (P=0.003), Entre el grupo control y butanólico (P=0.014)

**Tabla N°. 8: Hallazgos comparativos de la tira reactiva de Dipstick urinario en los cuatro grupos.**

	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo Metanólico</b>	<b>Grupo Acuoso</b>	<b>Grupo Butanólico</b>
<b>pH</b>				
• 5	0/6	0/6	0/6	0/6
• 6-7	0/6	0/6	0/6	0/6
• 8-9	6/6	6/6	6/6	6/6
<b>Densidad urinaria</b>				
• 1.000 *	6/6	5/6	5/6	6/6
• 1.005	0/6	1/6	1/6	0/6
• 1.010-1.015	0/6	0/6	0/6	0/6
• 1.020-1.025	0/6	0/6	0/6	0/6
• >1.025	0/6	0/6	0/6	0/6
<b>Glucosa (mg/dL)</b>				
• Negativo	6/6	6/6	6/6	6/6
• 50	0/6	0/6	0/6	0/6
• 150	0/6	0/6	0/6	0/6
• 500	0/6	0/6	0/6	0/6
• 1000	0/6	0/6	0/6	0/6
<b>Proteina (mg/dL)</b>				
• Negativo *	5/6	5/6	5/6	6/6
• 30	1/6	1/6	1/6	0/6
• 100	0/6	0/6	0/6	0/6
• 500	0/6	0/6	0/6	0/6
<b>Sangre (eritrocitos/μl)</b>				
• Negativo *	6/6	6/6	5/6	6/6
• 5-10	0/6	0/6	1/6	0/6
• 50	0/6	0/6	0/6	0/6
• 250	0/6	0/6	0/6	0/6

**P= 0.29**

No se encontraron diferencias entre los grupos al aplicar el test de proporciones

**Tabla N°.9: Score histológico de daño renal**

	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo Metanólico</b>	<b>Grupo Acuoso</b>	<b>Grupo Butanólico</b>
Componente intersticial				
• Inflamación	0/6	0/6	1/6(grado 1)a	0/6
• Fibrosis	0/6	0/6	0/6	0/6
Componente glomerular				
• Proliferación mesangial	0/6	0/6	1/6(grado 1) a	0/6
• Proliferación celular	0/6	0/6	0/6	0/6
• Engrosamiento capilar	0/6	0/6	0/6	0/6
• Vacuolización	0/6	0/6	0/6	0/6
Componente vascular				
• Hialinización	0/6	0/6	1/6 a	0/6
• Necrosis fibrinoide	0/6	0/6	0/6	0/6
• Hipertrofia muscular	0/6	0/6	2/6 b	0/6
Componente tubular				
• Necrosis tubular	0/6	0/6	1/6 a	0/6

a: P= 0.29

b: P= 0.12

Aplicando el test de proporciones no se encontró diferencias significativas entre los grupos al emplear el score de daño histológico. Los hallazgos de proliferación mesangial, hialinización e hipertrofia muscular se encontraron en el mismo animal.

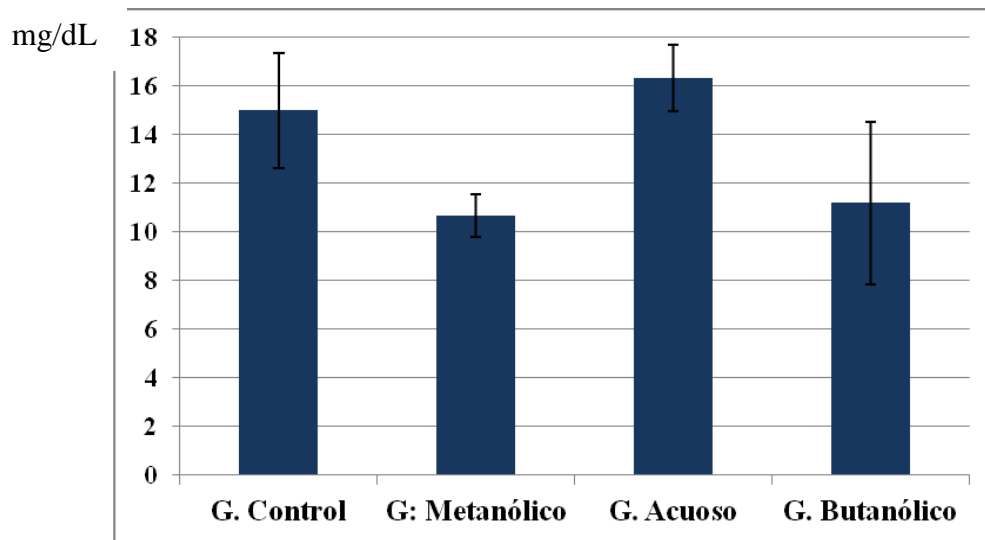
**Tabla N°. 10: Volúmenes glomerulares según el grupo al que pertenecen**

	Volumen glomerular	
	X	SD
Grupo control ( $\mu\text{m}^3$ )	363969.58	27065.609
Grupo Metanólico ( $\mu\text{m}^3$ )	369341.78	11179.078
Grupo Acuoso ( $\mu\text{m}^3$ )	380028.53	23133.837
Grupo Butanólico ( $\mu\text{m}^3$ )	382891.4	24352.326

P=0.43 (Anova Oneway). No se encontraron diferencias en el volumen glomerular promedio entre los grupos.

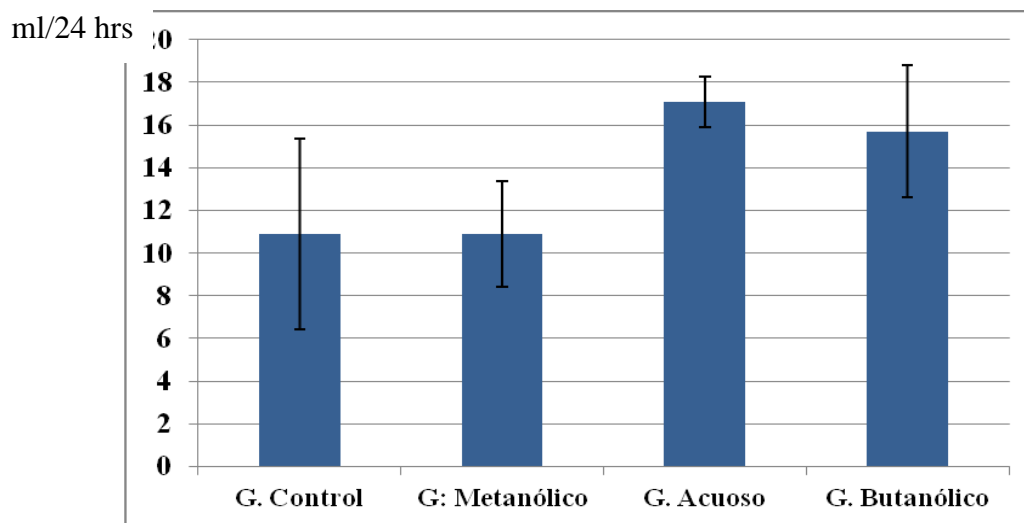
## 11.2 Gráficos

Gráfico N°. 1: Calcio sérico total



P= 0.0004 (Anova Oneway). P= 0.017 Grupo control vs metanólico, P= 0.04 grupo control vs butanólico. P= 0.002 grupo metanólico vs acuoso. P= 0.004 grupo acuoso vs butanólico.

Gráfico N°. 2: Volumen urinario según grupos



P= 0.008 (Anova Oneway). \* P= 0.028 grupo control vs acuoso. \*\* P= 0.037 grupo metanólico vs acuoso.

### 11.3 Fotos

Foto N°. 1: Vista anterior de una jaula metabólica individual



Foto No. 2: Vista posterior de una jaula metabólica



Foto N°3. A: Detalle del área del bebedero. B: Área del alimento.



Foto No. 4:A: Vista inferior de la jaula metabólica, B. Cesta donde quedan retenidas las excretas.

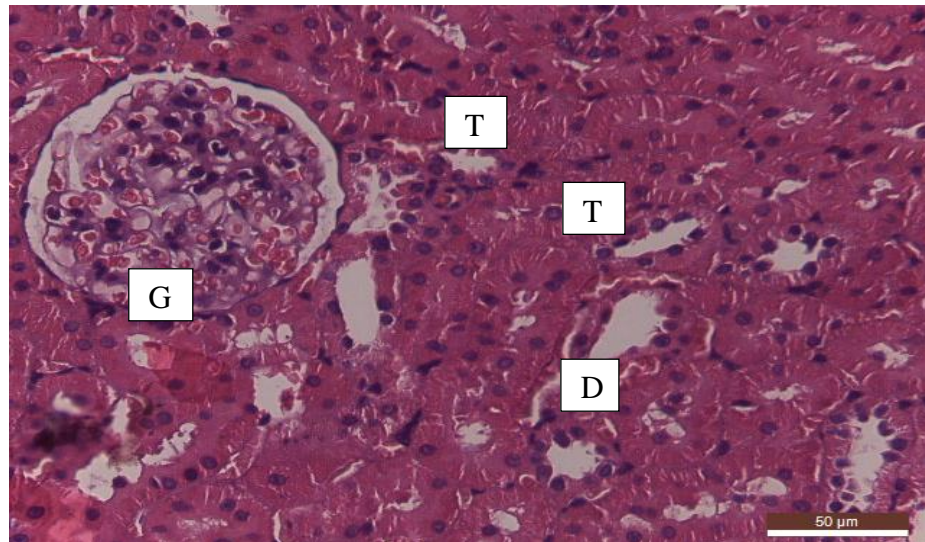


Foto No. 5: Animales en jaulas metabólicas. Recolección de orina en probetas individuales



Foto N° 6. Grupo Control. 6.A Se observa un glomérulo a un aumento de 40X. Se puede apreciar el ovillo glomerular (G). Hacia la derecha se encuentran los túbulos renales proximales (T) y distales (D). 6.B Se realizaron las mediciones de los dos diámetros mayores. Dicha información se empleó para el cálculo del volumen glomerular.

6.A



6.B.

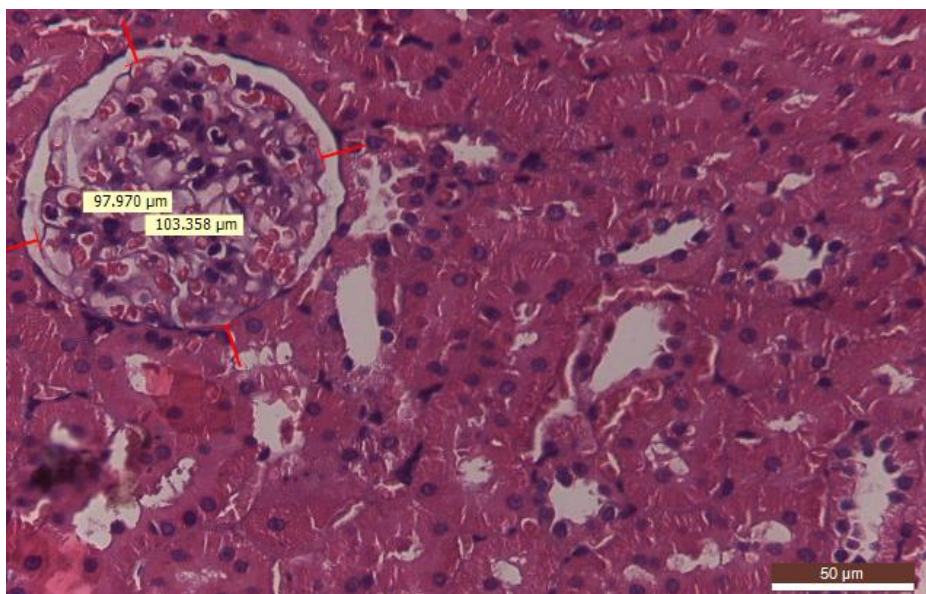
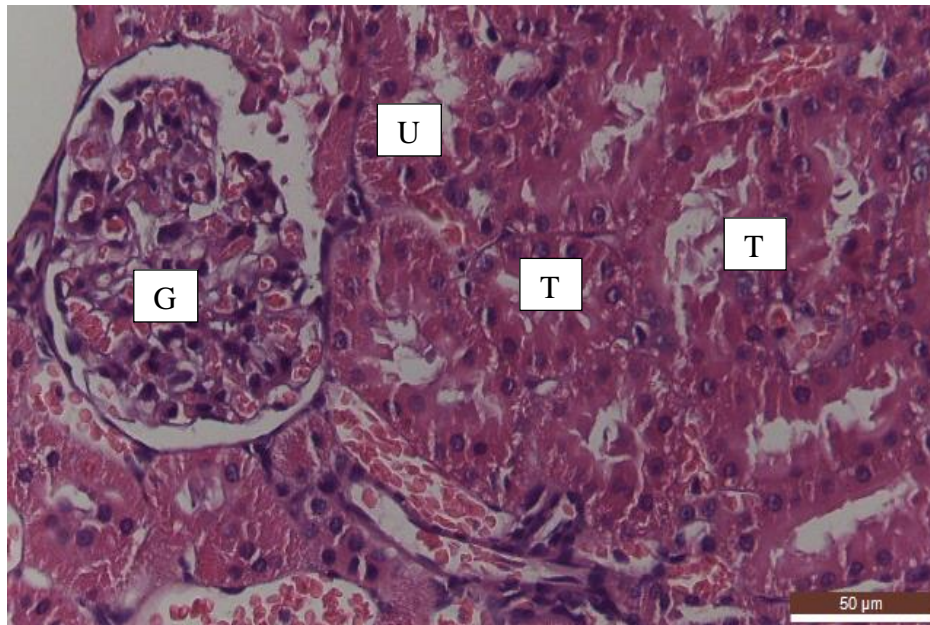


Foto N° 7. Grupo Control. 7.A Se observa un glomérulo a un aumento de 40X. Se puede apreciar el ovillo glomerular (G). Hacia la derecha se encuentran los túbulos renales proximales (T). Se observa el inicio del polo urinario (U). 7.B Se realizaron las mediciones de los dos diámetros mayores. Dicha información se empleó para el cálculo del volumen glomerular.

7.A



7.B

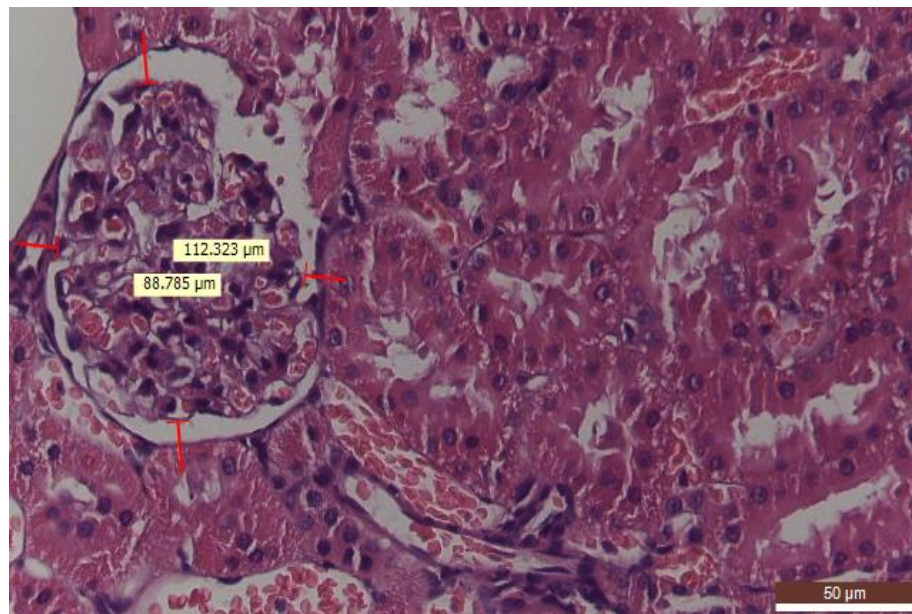
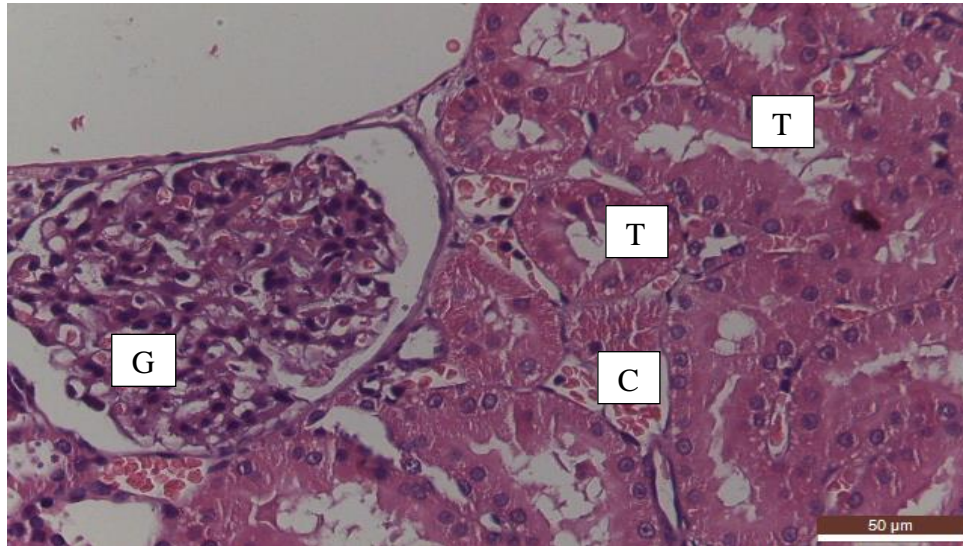


Foto N°8. Grupo Metanólico 8.A. Se observa un glomérulo a un aumento de 40X.

Se puede apreciar el ovillo glomerular (G). Hacia la derecha se encuentran los túbulos renales proximales (T) y algunos capilares peritubulares (C). 8.B Se realizaron las mediciones de los dos diámetros mayores. Dicha información se empleó para el cálculo del volumen glomerular.

8.A



8.B

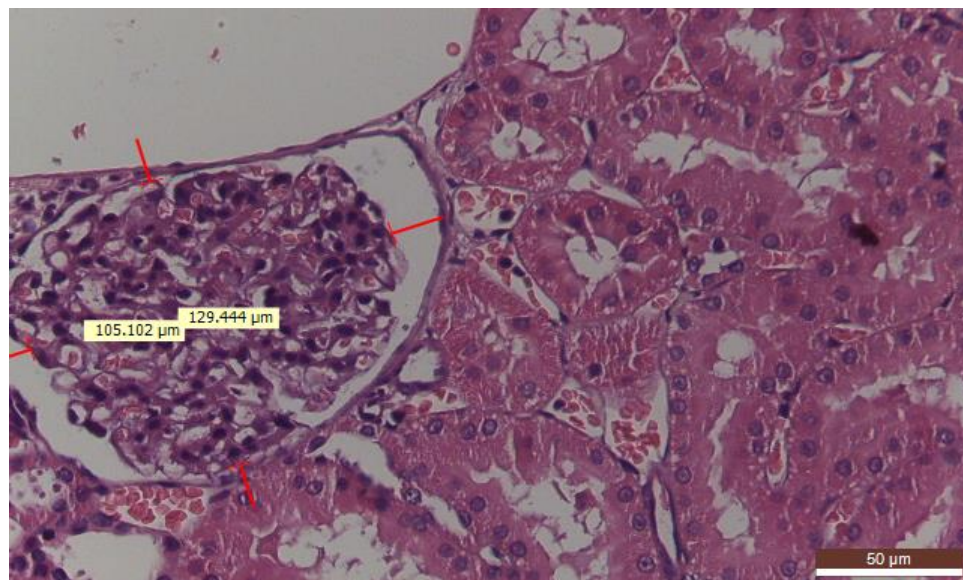
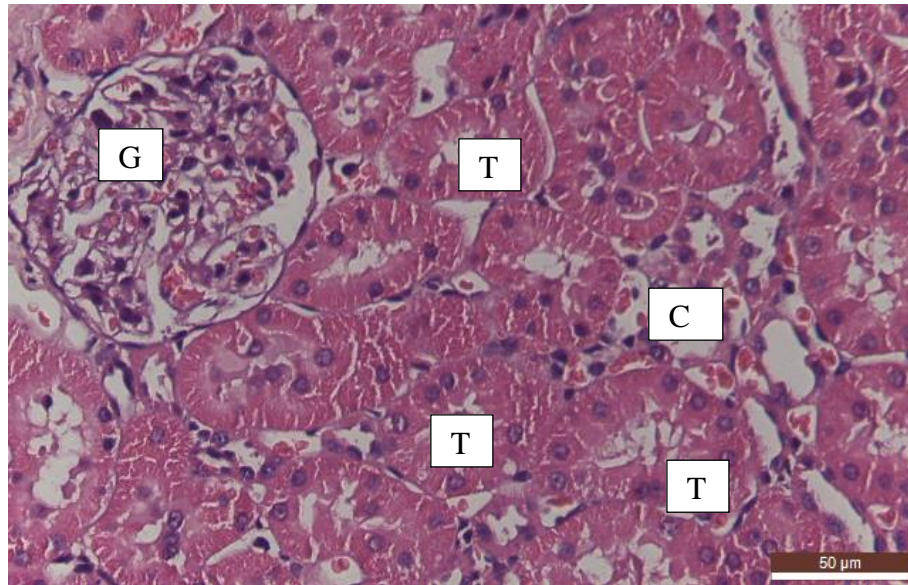


Foto N°9. Grupo Metanólico. 9.A se observa un glomérulo con un aumento de 40X. Se puede apreciar el ovillo glomerular (G). Hacia la derecha se encuentran los túbulos renales (T). Se observa también una red de capilares periglomerulares (C). En la foto 9.B se realizaron las mediciones de los dos diámetros mayores. Dicha información se empleó para el cálculo del volumen glomerular.

9.A



9.B

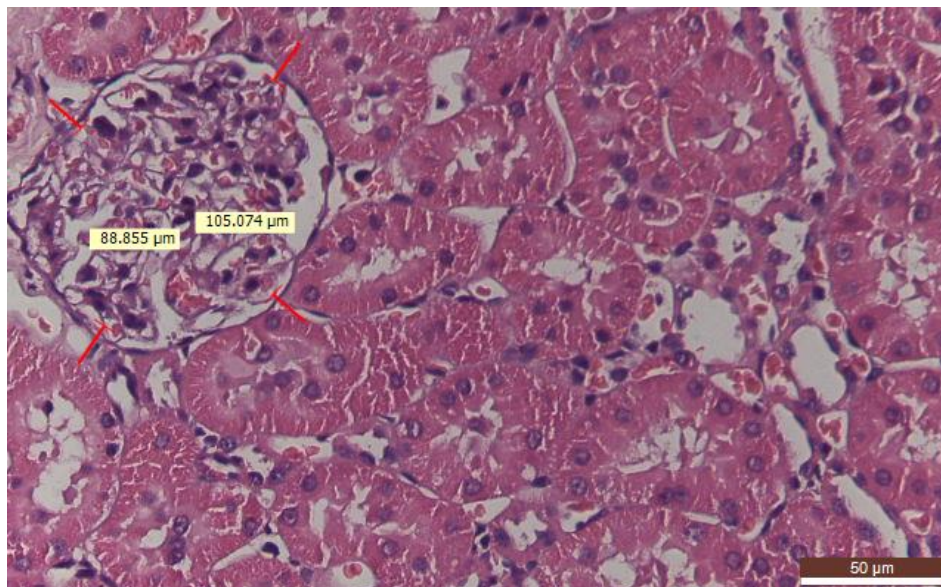
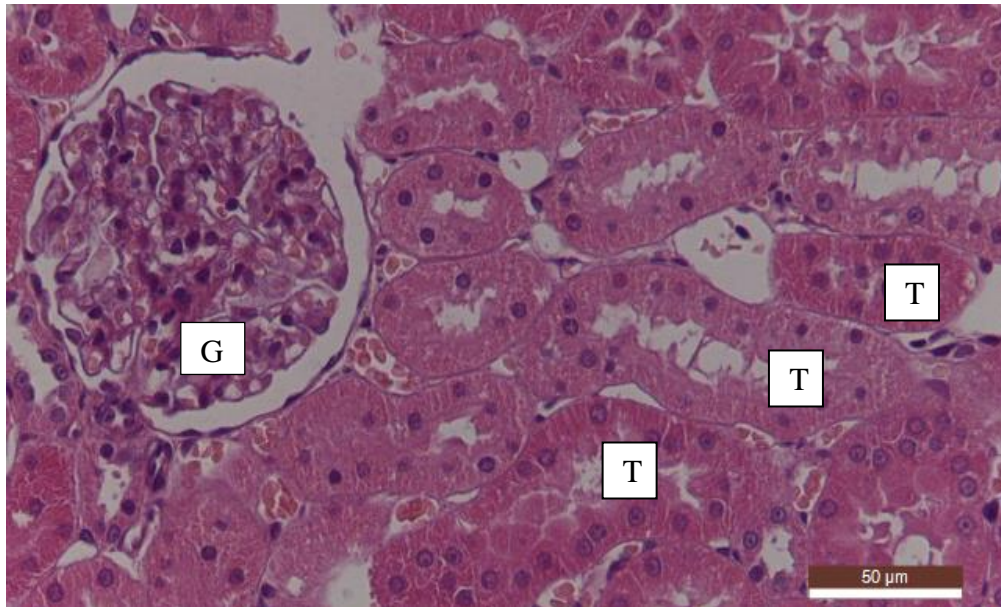


Foto N°. 10. Grupo acuoso. 10.A Se observa un glomérulo a un aumento de 40X. Se aprecia el ovillo glomerular (G) y hacia la derecha el sistema tubular (T) 10.B. Se observan los registros de las medidas de dos diámetros para el cálculo del volumen glomerular.

10.A



10.B

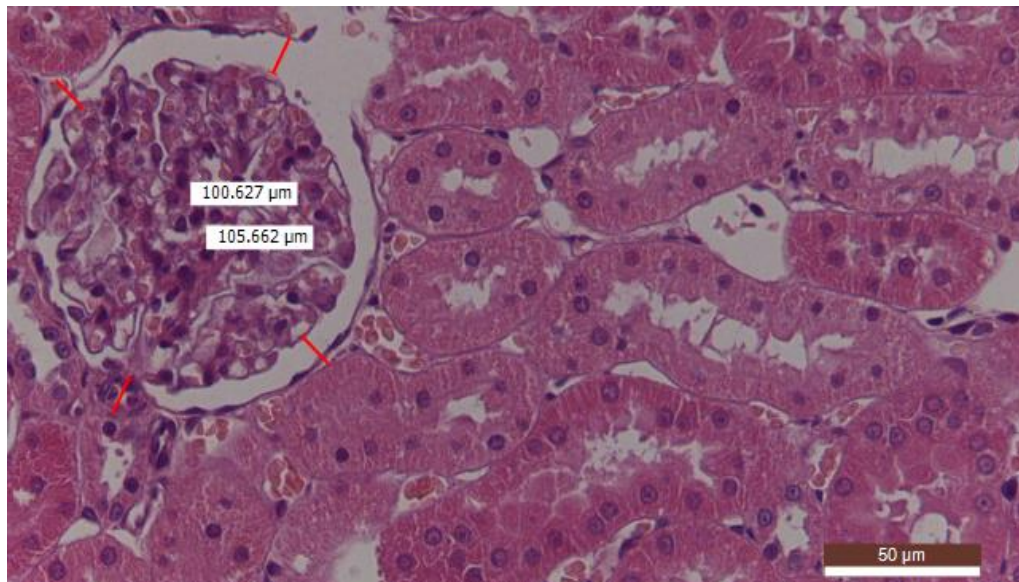
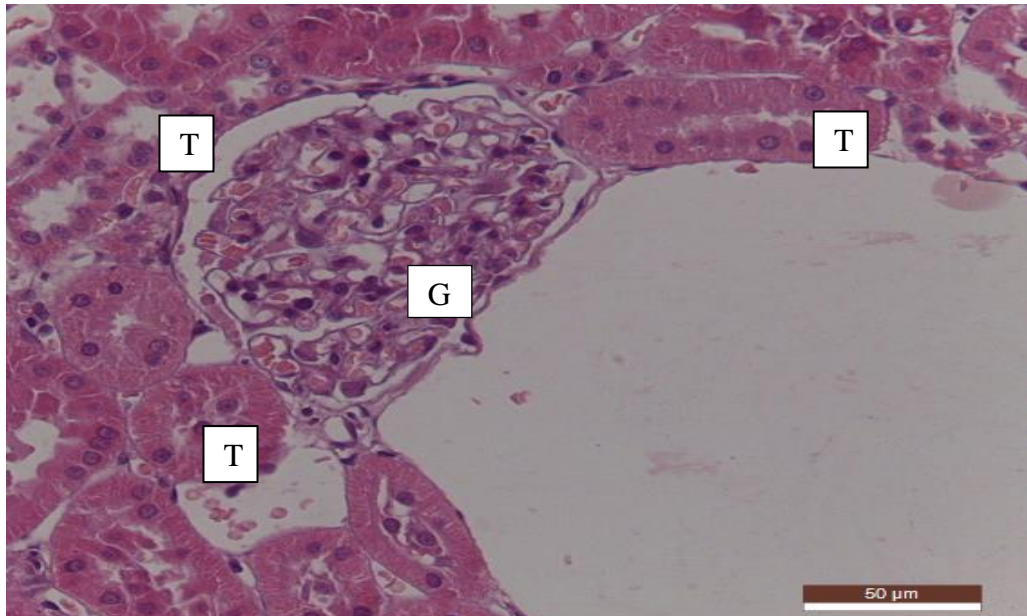


Foto N°. 11. Grupo acuoso. 11.A Se observa un glomérulo a un aumento de 40X. Se observa el ovillo glomerular (G) y túbulos renales (T) . 11.B. Se observan los registros de las medidas de dos diámetros para el cálculo del volumen glomerular.

11.A



11.B

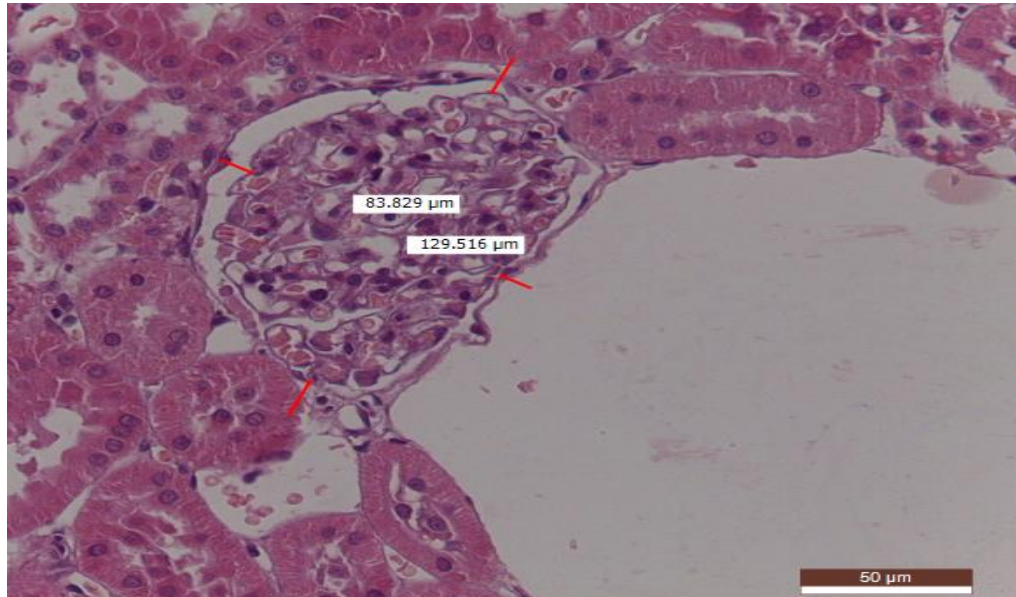
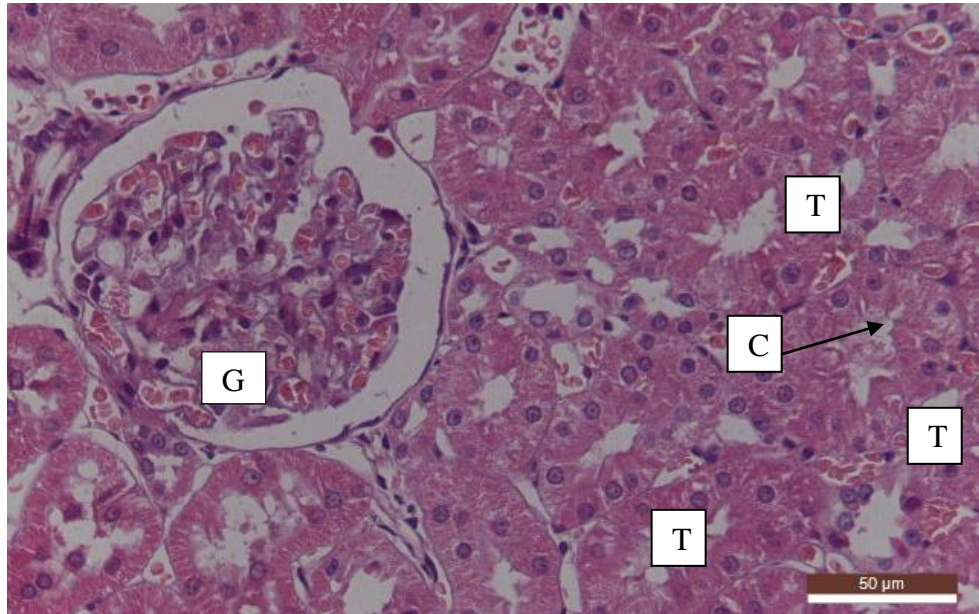


Foto N°. 12. Grupo butanólico. 12.A Se observa una glomérulo a un aumento de 40X. Se observa el ovillo glomerular (G) y hacia la derecha el sistema tubular. (T). Se aprecian capilares peritububulares (C). 7.B. Se observan los registros de las medidas de dos diámetros para el cálculo del volumen glomerular.

12.A



12.B

