



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

---

**Trabajo de Tesis de Maestría:**

**“Evaluación de la cardioprotección de la harina de raíz de maca (*Lepidium meyenii* Walp) en la isquemia y reperfusión cardíaca de ratas jóvenes y seniles”**

---

**Tesista:**

**Farm. Soledad Inés Matera**

**Directora:**

**Prof. Dra. Alicia E. Consolini**

**Codirector:**

**Dr. Germán A. Colareda**

**Año: 2020**

## **Agradecimientos**

Agradezco a la **Universidad Nacional de La Plata** por haberme otorgado la beca con la cual pude realizar la Maestría de Plantas Medicinales.

Al **Grupo de Farmacología Experimental y Energética Cardíaca** de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, por haberme brindado el espacio de investigación y por la calidad humana de los integrantes, **Prof. Dra. Alicia E. Consolini, Dr. Germán A. Colareda, Dra. Inés Ragone y Farm. Matías Bayley**, que me ayudaron en la realización de los experimentos y en mi formación.

A la **Prof. Mg. Sc. Marta Colares** de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNLP que me orientó en la identificación de la planta.

A la **Prof. Dra. María Luján Flores** y al **Prof. Dr. Osvaldo Córdoba**, del Grupo de Investigación en Química, Bioactividad y Metabolismo de Recursos Naturales Patagónicos del CRIDECIT, Universidad Nacional de la Patagonia (UNPSJB), por los análisis fitoquímicos y antioxidantes.

A la **Dra. Luisa Tracy Carhuamaca Antezana** que me trajo *Lepidium meyenii* de la zona de producción de Perú.

A mis compañeros de la Maestría de Plantas Medicinales, ellos han sido un gran sostén y ha sido un placer compartir todo este tiempo: **Catalina Vanegas, Patricia Svarre, Jorge Manteiga, Milena Bonilla, Ana Mancuso, Albeza Rivera, Carmita Lojano, Silvia Fernández y Nubia Guzmán.**

*Dedico esta tesis a las personas más importantes en mi vida, mi mamá Raquel, que siempre está para todo lo que necesito, sin condiciones, y ha hecho que mi vida no sea tan difícil y yo sea feliz, a mi papá Juan Ramón que siempre está para un consejo práctico y mediador, mis tías Clari y Zuni que han sido las que más me han mimado, junto a mi abuela Lydia que ya no está físicamente pero sí muy presente en mi corazón. A mis hermanos que tienen perspectivas de la vida muy diferentes a la mía y me han hecho ver otros puntos de vista que me han enriquecido.*

*A mi esposo Ariel y a mi hijita Aurora por llenarme el alma de amor y por ayudarme para que hoy llegue hasta acá.*

*A mis suegros, Marta y Oriano, de los que he aprendido más de lo que ellos creen que puedan enseñar.*

*A mis sobrinos, que los adoro: Vera, Bianca, Valentín, Felicitas, Ámbar y Abigail.*

*A mi directora Alicia por creer en mí e impulsarme a que siga la carrera científica que tanto me gusta.*

## **Índice**

Agradecimientos	2
Dedicatoria	3
<b>Introducción</b>	<b>7</b>
Historia y etnobotánica de la maca	8
Descripción botánica de la maca	15
Fitoquímica de la maca	17
La maca como alimento	22
Actividades farmacológicas de la maca comprobadas experimentalmente	23
Fisiopatología de la isquemia y reperfusión cardíaca	28
Fisiología del ciclo de contracción-relajación	28
Fisiopatología de la isquemia y reperfusión	31
Homeostasis de calcio durante la isquemia y la reperfusión	32
Energética en la isquemia y reperfusión	38
Vías que conducen a la cardioprotección frente al daño isquémico	42
Rol de la PKC (Proteína quinasa C)	42
Rol de los canales mitocondriales de potasio dependientes de ATP (mKATP)	44
Rol de la NO-sintasa (eNOS)	45
Rol del intercambiador sodio por calcio mitocondrial (mNCX)	47
Flavonoides en la fisiopatología de la isquemia y reperfusión	49
Metabolismo de las isoflavonas	51
Efectos de los metabolitos de isoflavonas	55
Isoflavonas en la fisiopatología de la isquemia y reperfusión	56
Hipótesis	59
Objetivos	60
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>61</b>
Material vegetal	62
Animales	62
Análisis de la materia prima	63
Análisis del rótulo de la materia prima	63

Características micrográficas de la materia prima	63
Preparaciones biológicas para estudio farmacológico	64
Corazones arterialmente perfundidos	64
Microcalorimetría del corazón aislado perfundido	66
Aislamiento de cardiomiocitos	69
Microscopía confocal	69
Protocolos en cardiomiocitos	70
Soluciones y drogas.	71
Protocolos para el estudio del efecto y el mecanismo de acción de maca en la isquemia y reperfusión	73
Protocolos base del modelo de atontamiento severo por I/R	73
Efectos de la harina de raíz de maca	73
Estudio del mecanismo de cardioprotección	73
Análisis estadístico	76
<b>Resultados</b>	<b>77</b>
Rótulo	78
Resultados del análisis de materia prima	80
Evaluación de los efectos de maca por administración oral	84
Efectos de la harina de maca por administración oral en la I/R de corazones de ratas macho jóvenes	84
Efectos de la harina de maca por administración oral en la I/R de corazones de ratas hembra jóvenes	89
Evaluación de los efectos de maca por administración oral en la I/R de corazones de ratas hembra seniles	93
Evaluación del mecanismo de acción de la maca en la isquemia y reperfusión	96
Rol de la PKC en los efectos de la maca	96
Rol de los canales mitocondriales de potasio (mKATP) en los efectos de la maca	98
Rol de la NO-sintasa (NOS) en la cardioprotección de maca	100
Efecto de la combinación de L-NAME y 5-hidrodecanoato (5-HD) en la cardioprotección de maca	102

Rol del intercambiador sodio por calcio mitocondrial (mNCX) en la cardioprotección de maca	105
Efectos de maca en los niveles de calcio de cardiomiocitos aislados de corazón de rata	106
<b>Discusión</b>	<b>108</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>119</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>121</b>

# **Introducción**

## **Historia y etnobotánica de la maca**

Perú es un país con una riqueza inconmensurable en cuanto a flora se refiere, manteniendo tradiciones de uso y el conocimiento adquirido previo a la conquista española. Dentro de esta biodiversidad, se encuentran plantas que han sido muy importantes en el desarrollo cultural de los pueblos. Una planta muy interesante de la región es la maca, *Lepidium meyenii* Walp. (Figura 1). Tal es así que el cronista Cieza de León en el año 1553 realizó una descripción de la misma, sin identificarla, ubicándola en la provincia del Bombón (Chinchaycocha), que en la actualidad es el Departamento de Junín, en la cual explicó que los nativos la usaban como sustento (Cieza, 1988). Cien años más tarde, el Padre Bernabé Cobo refiere el nombre y las propiedades que se le adjudican sobre la mejora en la fertilidad en su libro “Historia del nuevo mundo” (Cobo, 1890). Así, tanto en la época precolombina como en la actualidad, el cultivo y el consumo principal de la maca se ubican en la zona andina de la Puna peruana, en los departamentos de Junín y Pasco (Figura 2), donde crece a más de 4000 metros sobre el nivel del mar, con condiciones ambientales adversas para otros cultivos, pero no para la maca (Hermann y Bernet, 2009).



Figura 1: Hipocótilos de maca amarilla de procedencia Perú.



Figura 2: Mapa de Perú y sitios de excavación donde se halló Maca. Adaptado de Rick y Moore.



Abajo izquierda: Mapa de la parte sur de la puna de Junín mostrando los sitios de excavación, Panaulauca y Pachamachay, donde se han encontrado restos de maca

Tanto las evidencias aportadas por los escasos manuscritos de la época de la conquista como las excavaciones realizadas por arqueólogos y paleontólogos en las cuevas de Panaulauca y Pachamachay (Figura 2), demuestran que el cultivo de maca ha sido importante para los habitantes de la zona, los cuales pudieron haberla domesticado alrededor del 1700 a.C. (Pearsall, 1989; Rick y Moore, 1999). Esto se evidencia por el aumento de tamaño de los hipocótilos y el crecimiento en abundancia a lo largo de la historia, obtenida de los estratos geológicos estudiados. Estos descubrimientos físicos, unidos a crónicas del tiempo de la Colonia que cuentan sobre la comercialización mediante el trueque en Chinchaycocha, el pago de tributos anuales al encomendador Juan Tello Sotomayor y las experiencias como mejorador de la fertilidad en animales domésticos y caballos, dan una buena idea de la importancia de la maca a través del tiempo en Perú (Hermann y Bernet, 2009).

Recién en 1964, el botánico Jorge León, rescató el conocimiento botánico y agronómico y lo difundió en el ámbito científico, con una descripción minuciosa de la planta, detalles específicos del cultivo tradicional, el uso y la comercialización entre los alrededores del lago Junín y la ciudad de Lima, para alimento de los nativos y los animales, y con fines medicinales para los españoles (León, 1964).

A lo largo del tiempo, debido a cambios culturales, el cultivo de la maca sufrió una disminución general y estuvo realmente en peligro de extinción, ya que en 1982 sólo se cultivaba en la zona del lago Junín. Afortunadamente existieron personas que tuvieron un rol clave para popularizarla. En 1980 la señora Timotea Cordova comenzó un

emprendimiento propio vendiendo una bebida caliente en el camino entre Lima y Huanuco, a la cual difundía por sus buenas propiedades sobre la fertilidad y la sexualidad. Por otro lado, aprovechando la creciente demanda, otro poblador comenzó a ofrecer maca seca en los mercados peruanos, con lo que logró valorizar económicamente el producto (Hermann y Bernet, 2009). Sumado a esto, en los años ´90, el gobierno local intentó impulsar el consumo de maca como política de estado para combatir la desnutrición, debido a su capacidad nutritiva y bajo costo, pero se le dificultó debido a las guerrillas. Sin embargo, hubo un fuerte interés económico que desencadenó una búsqueda de plantas con potencial de cultivo en el mundo provenientes de la zona de influencia del imperio Inca realizada por investigadores americanos, los que editaron el libro “Lost crops of the Incas” (1989), que contiene un capítulo exclusivo sobre la maca (Council National Research, 1989). En este libro se afirma que la maca habría crecido desde Ecuador hasta el norte de Argentina en cientos de hectáreas de terrazas de cultivo. Además, explica que las raíces frescas o secas se consumen en sopas o papillas, que se elabora una bebida fermentada (chicha de maca) mezclada con licor para hacer un “cóctel de maca”, budín y mermelada de maca, y que hasta las hojas son consumidas normalmente en ensaladas. Otro dato interesante es que la maca es utilizada como engordante del cobayo, conocido como “cuy”, que es un animal de gran valor alimenticio para los habitantes de la zona. Acompañando esta situación de crecimiento del cultivo y comercialización, se observa un marcado interés académico, aumentando drásticamente el número de estudios y publicaciones. Además Alemania y Suiza respaldaron el CIP (International Potato Center) y al sector

público para mejorar la conservación y uso de cultivo de raíces y tubérculos olvidados, entre ellos la maca. Por otro lado, una compañía farmacéutica peruana, Química Suiza, lanzó al mercado comprimidos nutracéuticos conteniendo harina de maca, comenzando a plantear un nuevo ámbito de uso para la Maca. Además, el Presidente Fujimori viendo el interés de EEUU, Japón y Europa por la maca incentivó a los productores y realizó, entre otras cosas, una publicidad en Japón para aumentar la exportación y las ganancias. En el año 2000 hubo una gran producción de maca, pero las ventas no fueron a la velocidad esperada y colapsó el precio, arruinando a muchos productores por no poder pagar sus préstamos. Este colapso fomentó a diferentes compañías a realizar y promover productos de Maca como alimento y en especialidades farmacéuticas, pero también promovió el mercado informal, adulteraciones e inseguridad en los consumidores. En base a esto, los productores de maca orgánica comenzaron a pedir certificaciones para sus productos (Hermann y Bernet, 2009).

Actualmente, Perú comercializa y exporta la raíz pulverizada, o sea, la “harina de maca”, pero China produce su propia harina para exportación y se ha insertado en el mercado con un producto más económico, aunque de inferior calidad. La maca china proviene del cultivo de raíces de *Lepidium meyenii* de Perú y variedades propias que no han podido patentar (Portillo, 2014) ya que Perú alega que la Maca le pertenece a su territorio y está prohibida la exportación de la raíz fresca. A pesar de todo esto, tanto Perú como China exportan maca a diversos países europeos, EEUU y Canadá (MINCETUR, 2016), porque se conoce la calidad superior de la maca peruana y el precio más conveniente de la maca china.

Aunque la maca es peruana y los habitantes locales la consumen en la actualidad, ha sido amplia la difusión a nuestro país, donde se consume como un nutracéutico. Por ello es importante conocer la evolución de esta planta en relación a la cultura del pueblo como punto de partida, y los estudios científicos que le han realizado. Durand Goyzueta (2017), en su tesis, realizó una investigación sobre los modelos de transmisión del conocimiento de la maca en tres distritos de la provincia de Junín, que son Carhuamayo, Junín y Óndores, los aspectos biológicos y las áreas potenciales para su cultivo. El autor del trabajo utilizó la técnica de observación participante, realizando caminatas etnobotánicas y entrevistas a los pobladores, encontrando que los principales transmisores del conocimiento son los abuelos (transmisión vertical), pero que los aportes externos en el distrito de Junín están creciendo entre los más jóvenes, es decir, la transmisión transversal (redes sociales, páginas de Internet) y horizontal (pares).

Por otro lado, en Argentina y específicamente en el conurbano bonaerense, con la fuerte inmigración de bolivianos y paraguayos ha ingresado al país la harina y productos derivados de la misma (cápsulas) (Arenas y col., 2011). Un dato no menor es que la autoridad sanitaria argentina ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica) prohíbe la comercialización en todo el territorio de maca, y productos que la contengan, debido a que no han cumplido con las reglamentaciones vigentes del registro. Esto se debe a que son considerados fitoterápicos porque tienen una indicación terapéutica de uso y, por lo tanto, no pueden ingresar como suplementos dietéticos (Disposición 5323, ANMAT,

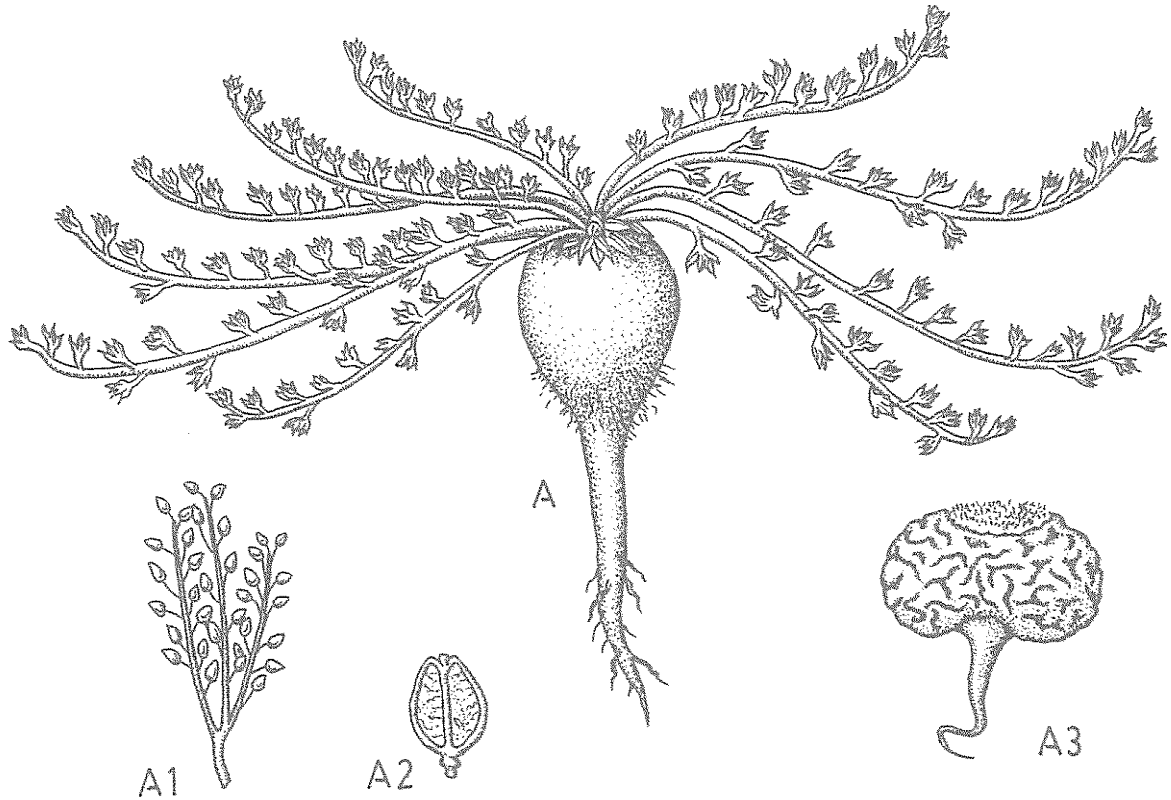
2016). A pesar de esta prohibición, los productos peruanos son ingresados por tierra desde Bolivia y comercializados en el Mercado de Liniers y en dietéticas (a través de distribuidores). En cuanto a los usos, con la harina se elaboran alimentos, pero en general se promocionan los productos por sus propiedades medicinales: vigorizante, afrodisíaco y estimulante sexual, por lo que se les ha dado la vulgar denominación de “ginseng peruano” o “viagra vegetal”. Es por todo esto que la harina de maca no se dispensa en farmacias, pero se la encuentra muy comúnmente en negocios de dietética. Esta tesis aportará conocimiento acerca de sus propiedades biológicas, lo cual contribuye a caracterizar un producto que está al alcance de la población de nuestro país.

## **Descripción botánica de la maca**

La especie *Lepidium meyenii* Walp. es una pequeña planta que crece a más de 4000 m.s.n.m., bajo condiciones muy extremas de frío, calor, radiación solar y vientos fuertes. Pertenece a la familia Brassicaceae (Trópicos, 2015), y a su género *Lepidium* pertenecen unas 175 especies. La parte aérea apenas sobresale del suelo, con hojas en roseta, pinnatipartidas, que se van renovando desde el centro continuamente (Rea, 1992). Las hojas basales presentan una estructura bifacial, con una gruesa cutícula adaxial. La parte subterránea presenta un órgano de reserva, constituido por la transición entre el tallo y la raíz, sin estar definido si es el hipocótilo de la planta (primer entrenudo) o la raíz (Marín-Bravo, 2003), por lo que se usan ambos términos indistintamente (Figura 3). Las dimensiones del hipocótilo son de 3 a 5 cm de ancho y 10 a 14 cm de largo, de colores que van desde el blanco crema al negro por las concentraciones de antocianinas que da origen a los ecotipos amarillo, rojo y negro de la maca. El tamaño del hipocótilo fresco se reduce cuando se seca para su almacenamiento y posterior molido para obtener la harina de maca.

La planta es bienal, en el primer año transcurre el crecimiento vegetativo durante el cual aumenta de tamaño el órgano de reserva y se cosecha. El segundo año florece, dando una inflorescencia en racimo y la generación de un fruto tipo silicua, que es dehiscente, con semillas que son tan pequeñas que cada planta puede liberar de cientos a miles de ellas, por lo que se necesitan pocas plantas para volver a realizar la siembra de la nueva producción (Hermann y Bernet, 2009).

Figura 3: Imagen adaptada de CULTIVOS MARGINADOS otra perspectiva de 1492. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Rea J., Ed. J.E. Hernández Bermejo y J. León. Roma 1992. A: Maca (*Lepidium meyenii*); A1. Inflorescencia en racimo; A2. Fruto en silicua; A3. Raíz seca.





## **Fitoquímica de la maca**

La maca fue muy importante nutricionalmente para los primeros pobladores, como se expuso al principio. Pearsall, Rick y Moore, publicaron los hallazgos de las excavaciones de las cuevas de Panaulauca y Pachamachay, y demostraron que el hipocótilo actual es el resultado de miles de años de selección de las plantas con mejores propiedades y de su domesticación. Los análisis fitoquímicos de la maca mostraron que los carbohidratos constituyen un 59%, los lípidos 2.2% y las proteínas 10.2%. Esta composición de nutrientes parece muy ventajosa, así como el contenido de fibras (8.5%). Presenta un buen perfil de aminoácidos esenciales y ácidos grasos insaturados, tales como ácido linoleico (32.6%), palmítico (23.8%) y ácido oleico (11.1%). Además posee fitoesteroles ( $\beta$ -sitosterol, campesterol, ergosterol, brassicasterol) y es rica en hierro, calcio y cobre. Estos valores demuestran que es un recurso alimenticio económico que podría ser efectivo para combatir la desnutrición (Dini y col., 1994). El  $\beta$ -sitosterol puede ser utilizado como marcador químico en la caracterización mediante cromatografía, ya que permite comparar los extractos de maca y suplementos dietarios que los contengan con una escala lineal y sensible adaptada a los rangos de concentración (Gutierrez Parvina, 2009). También se puede analizar la presencia de alcaloides imidazólicos (Lepidilina A y Lepidilina B) (Baoliang y col., 2003), alcanidas benciladas (macamidas) tales como la macaridina (1,2-dihidro-N-hidroxi piridina) y la N-bencilhexadecanamida (Muhammad y col., 2002), y macaenos (ácidos grasos bencilados). Se encontró que en maca seca las macamidas se

encuentran entre 0.06% a 0.52% y los macaenos entre 0.09% hasta 0.45% (Ganzera y col., 2002; Sifuentes-Penagos y col., 2015) (Figura 4).

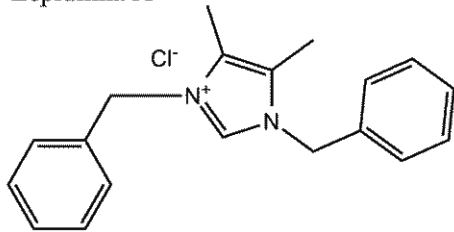
Los metabolitos secundarios de la maca más importantes, que serían los responsables del sabor picante, son los glucosinolatos que son heterósidos sulfocianogénéticos (Jones, 2006), de los cuales se han aislado nueve tipos y el glucotropaeolin (bencil glucosinolato) es el más abundante. Este glucosinolato y su metoxiderivado pueden ser importantes en la caracterización química ya que su combinación no aparece en otras plantas de la familia Brassicaceae (Dini y col., 2002, Fahey y col., 2001). Sin embargo, Yábar y colaboradores (2011) realizaron un estudio sobre el contenido de glucosinolatos mediante HPLC en los ecotipos amarillo, rojo y negro de la maca durante su pre-cosecha, cosecha y durante el secado posterior. Vieron que éstos aumentaban de forma gradual durante los 90 días antes de la cosecha y durante los 15-30 días de secado después de la cosecha, seguido por una importante disminución durante el periodo de 30-45 días del secado post-cosecha debido a las fluctuaciones de la temperatura. Esto se atribuyó a una ruptura celular que se correlacionó con la acción de la mirosinasa, también evaluada. Los autores concluyeron que habría que mejorar las técnicas de secado y preservación de los hipocótilos para mantener el contenido de glucosinolatos (Yábar y col., 2011).

Los mismos autores continuaron su investigación con el seguimiento de los compuestos fenólicos y su actividad antioxidante en los tres ecotipos de maca, observando que los análisis HPLC-PDA revelaron la prevalencia de 11 compuestos fenólicos, pero con diferentes concentraciones en cada

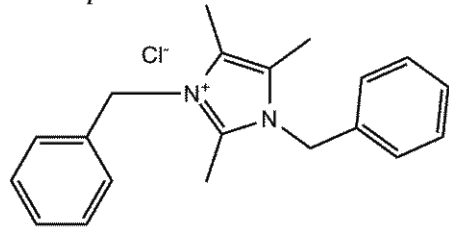
Figura 4: Metabolitos secundarios importantes de *Lepidium meyenii* Walp.  
Imagen realizada con el programa ChemDrawUltra10.0.

### Alcaloides imidazólicos

Lepidilina A

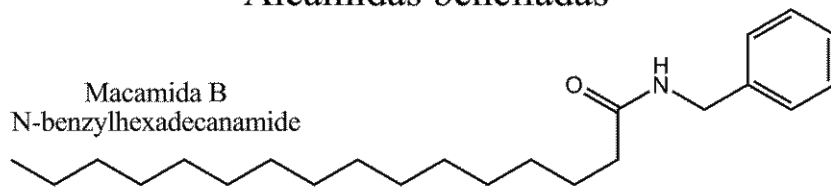


Lepidilina B

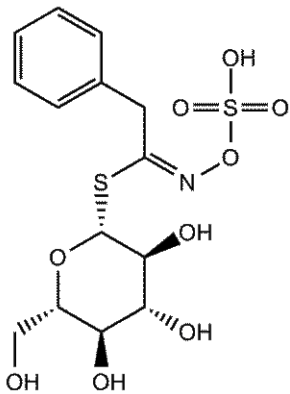


### Alcámidas benciladas

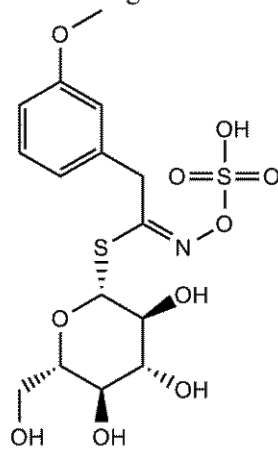
Macamida B  
N-benzylhexadecanamide



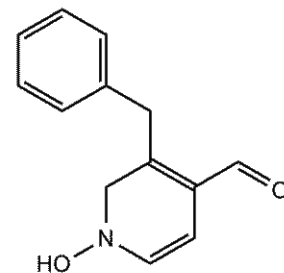
Bencil glucosinato



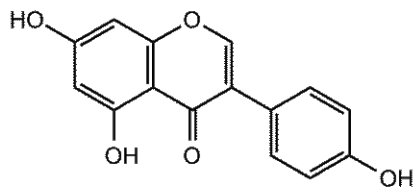
m-metoxibencil glucosinato



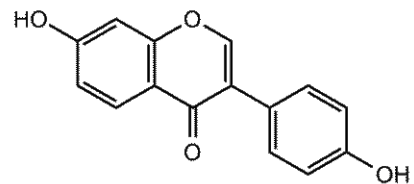
Macaridina



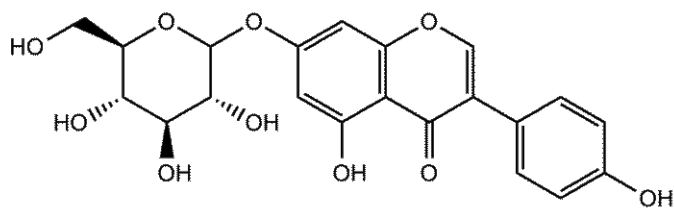
### Isoflavonas



Genisteína



Daidzeína



Genisteína 7-glucosido

ecotipo y en cada etapa de estudio. Seis compuestos eran derivados del flavanol (flavan-3-ol), cuatro derivados del ácido benzoico y un derivado del ácido o-cumárico. El secado post-cosecha en condiciones naturales, generó una pérdida significativa (maca amarilla 89.90%, maca roja 82.49% y maca negra 66.31%) de compuestos fenólicos, principalmente derivados del ácido benzoico y o-cumárico, llegando a límites no detectables, mientras que dos derivados del flavanol (flavan-3-ol) toleraron estas condiciones (Yábar y col., 2019).

Para este trabajo la materia prima a utilizar, harina de raíz de maca marca Kallpa, fue analizada por la Prof. Dra. María Luján Flores y el Prof. Dr. Osvaldo Córdoba, del Grupo de Investigación en Química, Bioactividad y Metabolismo de Recursos Naturales Patagónicos del CRIDECIT, Universidad Nacional de la Patagonia (UNPSJB).

El screening fitoquímico evidenció la presencia de carbohidratos, lípidos, péptidos, fenoles con dos hidroxilos adyacentes, flavonoides, esteroides y alcaloides.

Como parte de los flavonoides, se determinó la presencia de isoflavonas las cuales pudieron ser separadas con acetato de etilo a partir del extracto obtenido con etanol de 70°.

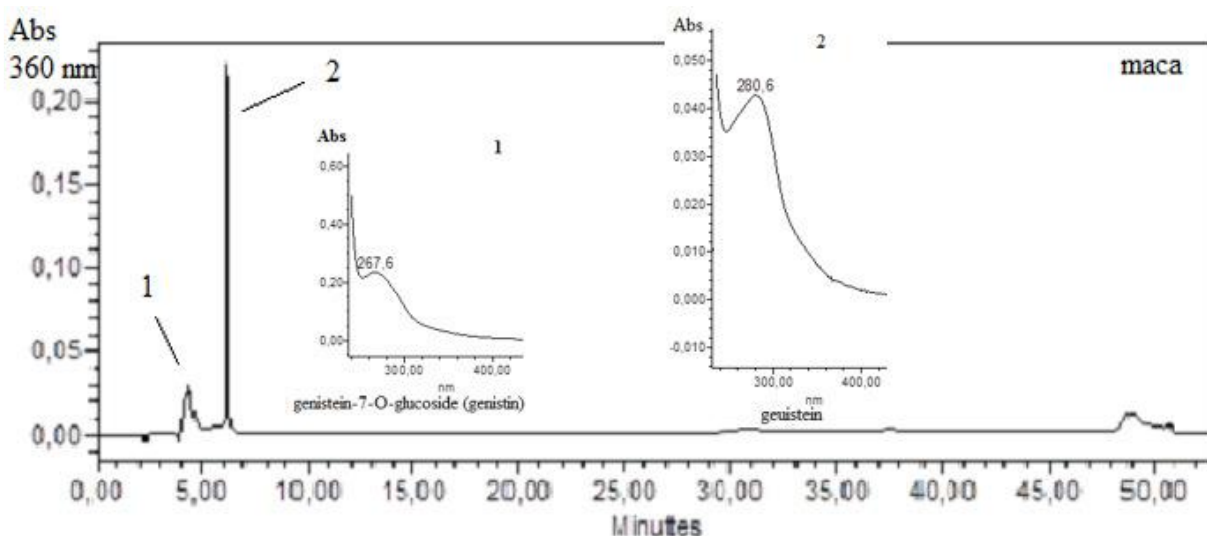
Mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, RP-HPLC-DAD, empleando un equipo Waters 1525 Binary HPLC, bomba e inyector Rheodyne, Waters 2996, fue posible determinar la naturaleza química de las isoflavonas. Se empleó un detector de arreglo de diodos (DAD), Waters symmetric 300 (5  $\mu$ ) columna C-18 (250 x 4.6 mm). La fase móvil consistió en acetonitrilo (A) y agua-ácido acético (40:1, B): 15% A y

85% B, durante 15 min, seguido por un gradiente lineal de 65 % B, por 30 minutos y posteriormente una transición aguda a 0% B en 2 minutos. La velocidad de flujo fue de 1.0 ml/min, a temperatura ambiente.

En la fracción de acetato de etilo del extracto obtenido de maca con etanol de 70°, fue posible evidenciar la presencia de genisteína 7-O-glucósido (genistina, 19.30 %), daidzeína (1.36 %) y genisteína (78.11 %) (Figura 5). También fue posible observar otra isoflavona aunque no pudo ser identificada.

Por otra parte el extracto de etanol de 70° no evidenció actividad antioxidante importante en el ensayo *in vitro* de inhibición del DPPH (medición de la absorbancia a 517 nm de la reducción del radical estable 2,2-difenil-1-picril hidrazilo o DPPH•), ya que resultó tener un 20.3 % de inhibición del DPPH.

Figura 5: Cromatograma de RP-HPLC-DAD y espectros UV de los principales compuestos presentes en la fracción de acetato de etilo proveniente del extracto de etanol de 70° obtenido a partir de la harina de la raíz de maca.



## **La maca como alimento**

En el estudio que realizó Gonzales (2010) en Carhuamayo, Departamento de Junín (Perú) sobre el consumo de maca en hombres y mujeres mayores de 35 años residentes de la zona encontró que la mayoría de los pobladores consumen maca, aún durante el embarazo y niños desde muy pequeños, y que presentan un mejor estado de salud, reflejado en los parámetros de dolor, vitalidad y el promedio general de salud (cuestionario estandarizado S-36 adaptado), con una protección a las fracturas por caídas leves en los consumidores mayores de 40 años. También encontró que el Mal de Montaña crónico (León-Velarde, 2005), un padecimiento de los que viven a más de 2500 m.s.n.m., que consiste en una serie de signos y síntomas como dificultad respiratoria, palpitaciones, dificultad para dormir, cianosis, dilatación de venas en manos o pies, parestesias en extremidades, dolor de cabeza y tinnitus, afectó menos a la población que consume maca. Además, tanto la presión arterial sistólica como el Índice de Masa Corporal fueron menores en los consumidores de maca, sin diferencias en el perímetro abdominal ni en la presión arterial diastólica. Tampoco se encontró diferencias en la edad de menarquia ni la edad de menopausia. La maca no modificó los parámetros bioquímicos como la glucosa, el lactato, el perfil lipídico ni el hepatograma.

Ante toda esta evidencia, se puede asegurar que la maca es un alimento seguro, ya que los pobladores de Carhuamayo la han consumido diariamente y desde pequeños, con mejores parámetros de salud y sin evidencia de problemas colaterales a su consumo.

## **Actividades farmacológicas de la maca comprobadas experimentalmente**

La maca es de interés científico desde hace poco más de 20 años ya que para Perú es un producto con fuerte proyección económica y con un considerable consumo. Por este motivo se han estudiado varias de sus propiedades, experimental y clínicamente. En un estudio clínico se encontró que el consumo de maca gelatinizada durante dos meses (3.0 g/día) mejoró el **deseo sexual** en varones normales, y sólo en dos semanas en deportistas (Gonzales y col., 2002). Además, en un estudio doble ciego de un extracto de maca seca (2.4 g/día) por tres meses se observó que hubo una pequeña mejora significativa sobre la disfunción eréctil leve (Zenico y col., 2009). Por último, un tercer estudio clínico mostró que pacientes con disfunción sexual inducida por el uso de antidepresivos del grupo de inhibidores de la recaptación de serotonina selectivos (IRSS), que consumían 3.0 g/día de maca tuvieron una mejoría en las pruebas de función sexual (Dording y col., 2008). También en mujeres menopáusicas hubo un efecto favorable de la maca sobre la disfunción o deseo sexual (Brooks, 2008).

Se conoce que la maca mejora la **fertilidad**, confirmada en ensayos donde se vio aumentada la espermatogénesis en ratas que fueron tratadas por dos semanas tanto con la decocción de los hipocótilos de maca como con el extracto hidroalcohólico (Gonzales y col., 2001 y 2003). En humanos, la administración de maca gelatinizada en varones sanos por 4 meses, en dosis de 1.5 g o 3.0 g mostró un aumento del volumen seminal, del conteo y de la movilidad de espermatozoides (Gonzales y col., 2001), sin modificar los niveles de hormonas sexuales (Gonzales y col., 2003), ni por activación del

receptor de andrógenos (Brooks, 2008, Bogani y col., 2006). Esto sugiere que los efectos de la maca sobre la calidad o cantidad de los espermatozoides se producen por otra vía diferente a testosterona y su receptor o a la hormona FSH. Estudios in vitro indican que tanto los extractos metanólicos como acuosos de maca muestran actividad estrogénica en líneas celulares MCF-7 (Valentová, 2006), pero no se ha encontrado acción en los receptores alfa estrogénicos (Brooks, 2008). La maca no afectó la tasa de implantación en ratón hembra (Oshima y col., 2003, Ruiz-Luna y col., 2005), tampoco aumentó el número de óvulos por ciclo (Gasco y col., 2008), ni afectó el desarrollo normal de los embriones preimplantacionales (D'Arrigo y col., 2004). Sin embargo, el extracto acuoso de maca aumentó el número de crías respecto al grupo control. Lo mismo se ha observado en cobayos tratados con 90 g de maca/día durante 100 días (Álvarez, 1993). En ratonas, la maca no afectó los niveles séricos de estradiol, pero aumentó los niveles de progesterona (Oshima, 2003). En ratas normales y ovariectomizadas se redujeron los niveles de estradiol por efecto de la maca y aumentaron los niveles de progesterona (Meissner y col., 2006). Sin embargo, en mujeres perimenopáusicas y en posmenopáusicas se observó una elevación en los niveles de estradiol (Meissner y col., 2006). Estos resultados dan cierto aval al uso de la maca para aliviar los síntomas perimenopáusicos.

**A nivel central**, se encontró que la maca tiene efectos sobre la memoria, la depresión y la ansiedad. La maca negra tuvo el mejor efecto sobre el aprendizaje espacial en ratonas ovariectomizadas; también revirtió el daño cognitivo inducido por la escopolamina en ratones macho, modelo que imita de manera aguda la enfermedad de Alzheimer (Voronina y col.,



2009). En este aspecto, se demostró que la maca inhibió la actividad de la acetilcolinesterasa, sin modificar los niveles de monoamino oxidasa (Rubio y col., 2007). En ratas se observó que el extracto pentánico presentaba una potencial aplicación como neuroprotector en ratas con infarto cerebral por oclusión de la arteria cerebral media (Pino-Figueroa y col., 2010). En humanos, la maca redujo los puntajes de depresión y ansiedad en varones adultos aparentemente sanos (Gonzales y col., 2006). Igualmente, la maca (3.5 g/día) durante seis semanas en mujeres posmenopáusicas redujo los síntomas psicológicos, incluyendo ansiedad y depresión (Brooks, 2008).

En cuanto a la **actividad energizante**, el extracto lipídico soluble de maca amarilla (100 mg/kg) aumentó la resistencia física un 40% en tres semanas y el extracto hidroalcohólico de maca negra la incrementó más de 500% (Choi y col., 2012). En humanos, el extracto de maca obtenido de raíces colectadas del Cerro de Pasco y procesadas, administrado por 14 días mejoró el tiempo de rendimiento en una carrera de ciclismo de 40 km comparado al valor basal (Stone, 2009). Además, en diez futbolistas profesionales que tomaron 1500 mg de concentrado de maca fresca por día, durante 60 días, se encontró un incremento en promedio de 10.3% en el consumo de oxígeno respecto a la condición previa (Ronceros y col., 2005).

En un modelo de **hiperplasia prostática benigna** (HPB) inducida por enantato de testosterona en ratas, un extracto acuoso liofilizado de maca roja fue capaz de revertir el crecimiento prostático, con patrón dosis-respuesta. Esto es aparentemente sin actuar sobre la 5-alfa-reductasa, sino probablemente dentro de la célula en factores de transcripción o en la vía estrogénica (Gasco y col., 2007).

Considerando los efectos en modelos de **osteoporosis**, en ratas ovariectomizadas tratadas con extractos etanólicos de maca a dosis oral de 0.24 g de extracto/kg durante 28 semanas, se encontró prevención de la pérdida ósea (Zhang y col., 2006). Se indicó que la maca roja y la maca negra, pero no la amarilla, presentan efecto sobre la osteoporosis, similar al estradiol (Gonzales C y col., 2010).

A diferencia del estradiol, ninguno de los tratamientos con las tres variedades de maca incrementó el peso uterino, lo que sugiere que la maca tiene una acción específica sobre el hueso (Gonzales C y col., 2010). Es bien conocido que el estradiol actúa en dos receptores genómicos, alfa y beta, y uno no genómico mediado por proteína G. El receptor beta de estradiol es el responsable de la inhibición de la resorción ósea, y no está mayormente expresado en el útero (Harris, 2007). Esto sugiere que la maca podría activar receptores beta estrogénicos para prevenir la osteoporosis.

Un estudio en los Andes centrales muestra que los consumidores de maca tienen menos tasas de fractura que aquellos de la misma zona que no consumen maca (Gonzales C, 2010), corroborando los resultados experimentales encontrados en animales (Gonzales GF, 2010).

En pacientes con **síndrome metabólico**, la administración de maca en dosis de 0.6 g/día durante 90 días incrementó moderadamente la enzima aspartato aminotransferasa (AST) y la presión arterial diastólica (Valentová y col., 2008). Esto no ha podido ser confirmado en otros estudios que muestran que la maca reduce la presión arterial tanto sistólica como diastólica (Gonzales y col., 2005 y 2006; Gonzales, 2010, Ranilla y col., 2010). Esto puede deberse al alto contenido en potasio (Valerio y Gonzales,

2005) o a la actividad inhibidora de la enzima convertora de angiotensina descrita in vitro (Ranilla y col., 2010). Igualmente, en estudios experimentales en animales hipercolesterolémicos la maca no solo no es tóxica, sino que protege mejor que la atorvastatina contra el daño hepático de la hipercolesterolemia (Oré y col., 2004).

## **Fisiopatología de la isquemia y reperfusión cardíaca**

### **Fisiología del ciclo de contracción-relajación**

El corazón regula su contracción a través de la longitud diastólica de los miofilamentos y su sensibilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , y además de la cantidad de  $\text{Ca}^{2+}$  que los alcanza. Es bien conocido que el miocardio depende del  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular para poder contraerse a través de un sistema de amplificación de la señal: liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ .

Cuando el miocardio está en reposo (diástole) todos los compartimentos intracelulares están en equilibrio con una concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólica de  $0.1 \mu\text{mol/l}$ , mientras la lámina externa del sarcolema (SL) está en equilibrio con una  $[\text{Ca}^{2+}]_o$  de  $1.8 \text{ mmol/l}$  (extracelular). Esta diferencia se mantiene por el continuo funcionamiento de los transportes de remoción de  $\text{Ca}^{2+}$ , sean activos primarios como las bombas de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (SERCA2a, que mueve  $2 \text{ Ca}^{2+}/\text{ATP}$ ) y del sarcolema (mueve  $1 \text{ Ca}^{2+}/\text{ATP}$ ), o secundario como el intercambiador Na por Ca (NCX) acoplado a la Na,K-ATPasa (Bers, 2001).

Durante la fase 2 del potencial de acción (PA) el  $\text{Ca}^{2+}$  ingresa a la célula a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L y dada la cercanía espacial activa la apertura de los canales de Ryanodina (RyR2), por lo cual se dispara la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico (RS).

El canal RyR2 es capaz de liberar pequeños cuantos de  $\text{Ca}^{2+}$  aún en el reposo diastólico, que se denominan “*sparks*” (chispas) y cuando se activa la corriente  $I_{\text{Ca,L}}$ , muchos *sparks* se sincronizan para formar ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  (“*waves*”) que recorren longitudinalmente al cardiomiocito (Mattiuzzi y col.,

2015). El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado en ondas sincrónicas se suma temporal y espacialmente para dar un “transitorio” de  $\text{Ca}^{2+}$  (“*transient*”).

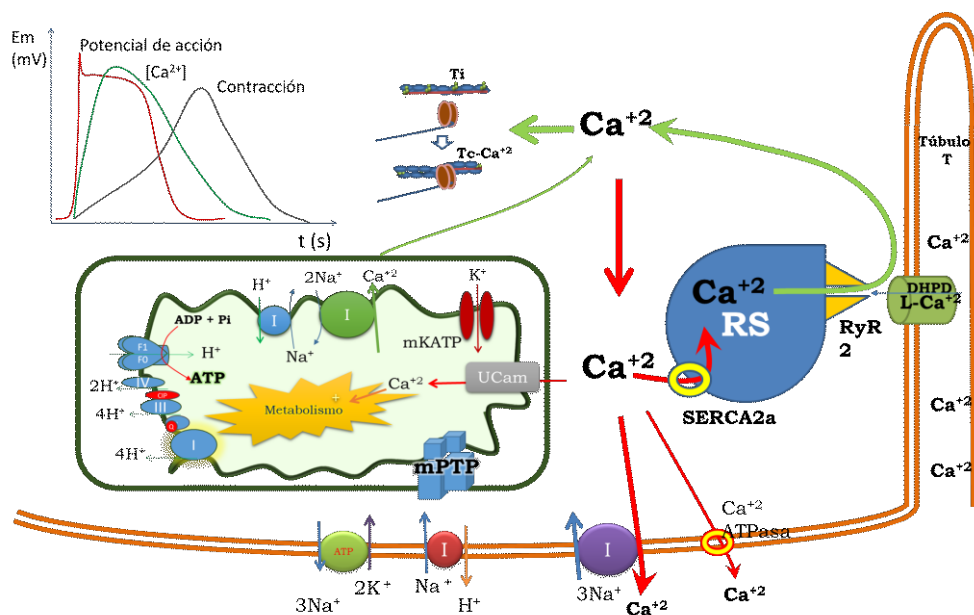
El transitorio de  $\text{Ca}^{2+}$  llega a los miofilamentos para enlazarse a la troponina C (TnC) en una reacción exotérmica, y activar la contracción. El complejo troponina (T, I y C) con tropomiosina sufre un cambio conformacional por el que Tn-I libera el sitio activo de la molécula de actina, se forma el puente actinomiosínico y se activa la ATPasa de la cabeza de miosina, que produce la energía libre necesaria para el deslizamiento de los miofilamentos actomiosínicos, responsables de la contracción.

Simultáneamente, parte del  $\text{Ca}^{2+}$  del "cleft" es removido de la célula por moléculas del intercambiador NCX (acoplado al gradiente de la Na,K-ATPasa), lo cual reduce inicialmente el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Por otro lado, se recapta  $\text{Ca}^{2+}$  por la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del RS (SERCA2a) (estequiometría 2  $\text{Ca}^{2+}$ /ATP) de manera proporcional a la cantidad liberada previamente del mismo (Bers, 2001). Otra pequeña parte es captada por las mitocondrias mediante el uniporter de calcio (UCam) que permite la captación dependiente del gradiente electroquímico de la membrana mitocondrial interna ( $\Delta\Psi_m$  de -180 mV). De esta forma, la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial genera un consumo de oxígeno, ya que se mueven 1  $\text{Ca}^{2+}$  por cada 2  $\text{H}^+$  y 12  $\text{H}^+$  por  $\text{O}_2$  en la cadena respiratoria (Curtin y Woledge, 1978). La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en la matriz mitocondrial ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ) está principalmente regulada por la extrusión a través de otro intercambiador de  $\text{Na}^+$  por  $\text{Ca}^{2+}$  ubicado en la membrana interna mitocondrial (mNCX) (Gunter y col., 2000). Este es dependiente del nivel de  $\text{Na}^+$  citosólico, mientras el uniporter responde a los pulsos de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (Liu y O'Rourke, 2008). La  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  oscila en picos

que resultan proporcionales al transitorio citosólico (Liu y O'Rourke, 2008). La  $[Ca^{2+}]_m$  resultante es capaz de activar a tres de las enzimas del ciclo de Krebs en modo proporcional: piruvato deshidrogenasa, isocitrato-deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (Crompton, 1990). De esta manera, la captación de  $Ca^{2+}$  mitocondrial produce un acoplamiento entre el consumo y la resíntesis de energía química (ATP) en el cardiomiocito.

Una vez inactivados los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L se logra el predominio de la remoción citosólica por sobre el influjo y liberación, con lo cual descende la  $[Ca^{2+}]_i$ , y se induce la disociación del  $Ca^{2+}$  de la TnC. En presencia de ATP, que reemplaza al ADP de la cabeza de miosina, ocurre la relajación por ruptura de los puentes actomiosínicos. Todas esas etapas de hidrólisis del ATP constituyen reacciones exotérmicas, que contribuyen al flujo de calor total del miocardio. La Figura 6 representa los mecanismos de acoplamiento excitación-contracción-relajación miocárdico.

Figura 6: Esquema del ciclo de contracción- relajación cardíaca.



## **Fisiopatología de la isquemia y reperfusión**

Las enfermedades crónicas cardiovasculares son las más frecuentes entre las causas de muerte. En particular el angor es un factor de riesgo importante, que puede acentuarse por la presencia de otros estados crónicos predisponentes como las alteraciones hormonales postmenopáusicas. La angina de pecho, o angor, es el resultado de la isquemia miocárdica, generada por un desequilibrio entre la oferta de oxígeno a través del flujo sanguíneo coronario y la demanda de oxígeno del miocardio. La causa más común de angor es el “síndrome agudo coronario” debido a ateroma o a vasoespasmos coronarios, al cual predisponen la edad, las hiperlipidemias y la deficiencia estrogénica en mujeres (Korcick y Lancaster, 2013).

La isquemia miocárdica (I) ocurre cuando el flujo sanguíneo hacia el corazón es disminuido o suspendido, de forma tal que disminuyen tanto el aporte de nutrientes como el de oxígeno hacia el músculo cardíaco (Halestrap y col., 2007). La disfunción se desarrolla principalmente en la reperfusión (R), con un daño funcional más o menos severo al miocardio, que será reversible o irreversible dependiendo de la duración de la isquemia (Bernardi y Di Lisa, 2015). La I/R ocurre bruscamente en patologías como el angor inestable (por vasoespasmos) y el angor silente (en el sueño). También puede ser provocada como corrección con anticoagulantes de un ataque anginoso, y cuanto más tarde se intervenga menor es la posibilidad de recuperación miocárdica. Por todo esto, es importante encontrar una farmacología preventiva a emplear ante los primeros indicios de riesgo

isquémico. La fitoterapia provee un modo sencillo de prevenir patologías, en el caso de que se determine la actividad beneficiosa.

### **Homeostasis de calcio durante la isquemia y la reperfusión**

El corazón bien oxigenado presenta una homeostasis de calcio y sodio dependientes del ATP continuamente resintetizado a nivel mitocondrial, lo cual permite la función normal de contracción y relajación de sus fibras. Bajo condiciones normales, el calcio continuamente se cicla entre el retículo sarcoplásmico (RS), el citosol y las mitocondrias. El calcio es bombeado al RS por la SERCA2a y liberado por los canales de Ryanodina. El calcio entra a las mitocondrias por el uniporter de Ca (UCam) y se libera por el intercambiador mNCX. Esta conexión cercana entre el RS, citosol y mitocondrias permite que las señales de calcio no solo realicen un fino ajuste del metabolismo celular sino que también modulan la apoptosis. El contenido de calcio del RS determina la sensibilidad de la célula al estímulo apoptótico (Demaurex y Distelhorst, 2003).

La hipoperfusión o la isquemia disminuyen el oxígeno disponible en el cardiomiocito, promoviendo una serie de daños que dependiendo de la duración de la isquemia, pueden oscilar entre el atontamiento severo y el desarrollo de mecanismos de muerte celular, como apoptosis, necrosis o autofagia (Murphy y Steenbergen, 2008). La reperfusión es la etapa en la cual se desencadenan estos mecanismos de disfunción, que llevan al corazón hacia la reducción o a la pérdida de la función contráctil y al infarto (Bolli y Marban, 1999).



El corazón atontado (o “stunned”) se define como aquél que luego de sufrir un episodio de isquemia transitoria, recupera parcialmente su contractilidad durante la reperfusión sin desarrollar infarto significativo. Es la disfunción mecánica que persiste después de la reperfusión a pesar de la ausencia de daño irreversible y de la restauración del flujo coronario normal o casi normal (Bolli y Marban, 1999). Esta disfunción no es usualmente un problema grave en la clínica médica debido a que desaparece espontáneamente después de revertir una oclusión coronaria y responde positivamente al uso de agentes inotrópicos.

En cambio, episodios más prolongados de isquemia promueven durante la reperfusión la apoptosis y muerte del tejido miocárdico, con pérdida irreversible de la función contráctil en regiones del corazón de variable extensión.

### *¿Qué ocurre en la isquemia?*

Cuando los cardiomiocitos dejan de recibir oxígeno por el corte de la perfusión se interrumpe la respiración aeróbica, ya que falta el aceptor final de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Esto afecta el gradiente en la membrana interna mitocondrial y el acoplamiento con la  $F_1F_0$ ATP-sintasa, con la consecuente disminución de la producción de ATP. Incluso las mitocondrias trabajan para restablecer el  $\Delta\Psi_m$  revirtiendo la función de la  $F_1F_0$ ATP-sintasa que pasa a funcionar en forma reversa hidrolizando ATP (Baines, 2009). Durante la isquemia, la matriz mitocondrial se contrae debido a la reducción de su gradiente electroquímico ( $\Delta\Psi_m$ ), lo cual causa la recíproca expansión del espacio intermembrana, y resulta en

una aumentada permeabilidad de la membrana externa al ADP y ATP, y promueve la rápida hidrólisis del ATP celular en las mitocondrias (Dos Santos y col., 2002). A consecuencia de esto, el ATP pasa a ser sintetizado sólo por la vía anaeróbica, con lo cual se genera ácido láctico que acidifica al citosol (Halestrap y col., 2004). La acidosis disminuye el acoplamiento actomiosínico, lo cual contribuye a la caída de la fuerza de contracción.

Otro factor que reduce rápidamente la fuerza contráctil durante la isquemia es que se afecta el influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales L, debido a la activación de canales de  $\text{K}^+$  sacolemales ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ). Estos canales se activan cuando los niveles de ATP se reducen, provocando que la fase 2 del potencial de acción se acorte (Cole y col., 1991).

Normalmente la Na,K-ATPasa elimina sodio citosólico y genera el gradiente que impulsa a otros intercambios iónicos como el intercambiador sodio por protón (NHE) y el intercambiador sodio por calcio (NCX). La reducción de los niveles de ATP por isquemia frena a la bomba, y reduce el gradiente para el NHE, lo que provoca acumulación citosólica de protones, agravando la acidosis (Murphy, 1991). También reduce el eflujo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediante el NCX, por lo cual después de algunos minutos de isquemia se produce un aumento del tono diastólico (contractura).

Por otra parte, la falta de ATP reduce la recaptación de calcio por la SERCA2 y el eflujo por la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa sarcolemal, mientras que en el caso de un muy reducido gradiente electroquímico de sodio podría inducir que el NCX funcione de forma reversa (Imahashi y col., 2005). Todo esto genera un aumento del calcio citosólico que contribuye a la contractura (aumento en LVEDP) típica de la isquemia.

### *¿Qué ocurre en la reperfusión?*

Durante el inicio de la reperfusión el O<sub>2</sub> aumenta, por lo que se restaura el metabolismo mitocondrial, y se recupera el nivel de síntesis de ATP. En consecuencia, se reactiva la Na,K-ATPasa y el pH también se normaliza rápidamente por eflujo de H<sup>+</sup> en intercambio con Na<sup>+</sup> vía NHE. Sin embargo, el consecuente incremento de la concentración de sodio citosólico reduce aún más el eflujo de Ca<sup>2+</sup> por el NCX, o lo revierte generando el influjo de Ca<sup>2+</sup>, lo cual produce un rápido incremento de la contractura (Schafer y col., 2001). En corazones de ratón se ha encontrado que en la reperfusión se produce una rápida liberación de Ca<sup>2+</sup> del RS que es proporcional a su contenido, por lo que se alcanza una alta concentración de calcio citosólico, se reclutan más cabezas de miosina y el cardiomiocito se contractura (Valverde y col., 2010).

El exceso de calcio citosólico hace que las mitocondrias capten más calcio y se genere la disfunción por activación de los mecanismos de apoptosis (Murphy y Steenbergen, 2008). Está bien establecido que un alto nivel de Ca<sup>2+</sup> citosólico promueve la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial (Motegi y col., 2007), lo cual dispara la activación del poro de transición de permeabilidad (mPTP) (Bernardi y Di Lisa, 2015). Por otra parte, en la reperfusión posterior a una isquemia prolongada se activan cascadas intracelulares pro-apoptóticas (Salas y col., 2010). Además, en la I/R suele ocurrir un daño oxidativo con aumentada producción de radicales libres, a nivel intracelular o por factores externos como fagocitos y células endoteliales, y disminución de los mecanismos celulares de defensa (Misra y

col., 2009). La reoxigenación durante la reperfusión puede activar una mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disparar mediadores para la apoptosis (Misra y col., 2009; Halestrap, 2009). Los ROS producidos durante la reperfusión representan la principal causa de injuria, ya que son producidos a nivel de los complejos I, II y III de la cadena respiratoria y afectan la integridad y la actividad respiratoria mitocondrial (Halestrap y col., 2004). Además, el exceso de ROS disminuye la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del RS, la cual juega un rol crucial en el manejo del  $\text{Ca}^{2+}$  cardíaco (Misra y col., 2009). Hay una interrelación entre las sobrecargas de  $\text{Ca}^{2+}$  y de ROS como disparadores de la disfunción post-isquémica (Garlid y col., 2009).

La producción de ROS puede ser reducida mediante intervenciones antioxidantes como las vitaminas E (alfa-tocoferol) y C (ácido ascórbico), y suplementos alimenticios antioxidantes como la yerba mate (Schinella y col., 2005), el té verde (Bordoni y col., 2002) y el vino tinto (Mosca y col., 2001).

La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial puede ser prevenida por reducción de la captación mediada por el UCam. La forma más documentada de reducir la captación es por la activación de los canales de  $\text{K}^{+}$  dependientes de ATP ubicados en la membrana interna mitocondrial (mKATP). La disminución de la disponibilidad de ATP abre dichos canales, el ingreso de  $\text{K}^{+}$  disipa la diferencia de potencial, y ello reduce el gradiente para el ingreso de calcio por el UCam. En consecuencia, la apertura de los mKATP protege a las mitocondrias de la sobrecarga de calcio. El diazóxido es un abridor de los canales mKATP, siendo 2000 veces más potente para activar el canal mitocondrial que el sarcolemal en miocitos cardíacos (Garlid, 2000; Garlid y

col., 2009). Además, el influjo de  $K^+$  mantiene el volumen de la matriz mitocondrial, el volumen del espacio intermembranoso y disminuye la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial al ATP y al ADP (Costa y col., 2006).

Los canales KATP son bloqueados por sustancias como la glibenclamida o el 5-hidroxidecanoato (5-HD), siendo sólo el 5-HD selectivo por el mKATP (Garlid y col., 1997; Murata y col., 2001). El uso de abridores del mKATP como el diazóxido ha sido mostrado como protector del daño observado en el corazón por modelos de I/R (Iwai y col., 2000; Carreira y col., 2005). Esta protección fue revertida en todos los casos por 5-HD. Considerando que el diazóxido y el 5-HD son selectivos por los mKATP el efecto cardioprotector fue adjudicado a la apertura de los mismos (Bernardi, 1999). Además de sus efectos sobre el mKATP, tanto el diazóxido como el 5-HD tienen efectos sobre el metabolismo mitocondrial (Hanley y col., 2002; Hanley y col., 2003). Mientras el diazóxido inhibe la cadena transportadora de electrones por inhibir a la succinato deshidrogenasa; el 5-HD actúa de sustrato para la Acil-CoA-sintetasa, produciendo un compuesto que puede actuar como sustrato para la Acil-CoA deshidrogenasa o inhibir esta enzima interfiriendo en la  $\beta$ -oxidación (Hanley y col., 2002 y 2003). Sin embargo, estos efectos no opacan la acción inhibitoria del 5-HD sobre la cardioprotección promovida por la apertura de los mKATP. Esta previene la hidrólisis del ATP mitocondrial (Costa y col., 2006) y la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  por disminuir el  $\Delta\Psi_m$ , que reduce la fuerza impulsora para el influjo de  $Ca^{2+}$  a través del UCam (Ishida y col., 2001; Murata y col., 2001).

## **Energética en la isquemia y reperfusión**

El corazón puede convertir energía química en trabajo (acortamiento) y calor. En las condiciones isovolumétricas no hay trabajo, pero sí acortamiento de fibras para desarrollar tensión o presión intraventricular, y mantenimiento de gradientes iónicos y movilización transitoria de  $\text{Ca}^{2+}$  para activar la contracción (Gibbs, 1979). El flujo de calor liberado por el corazón aislado latiendo es producido por las reacciones exotérmicas de hidrólisis del ATP necesario para el acoplamiento actomiosínico, y para los transportes activos primarios (Ca-ATPasas del retículo sarcoplásmico y del sarcolema que remueven el  $\text{Ca}^{2+}$  activador de la contracción, y Na,K-ATPasa para mantener el gradiente electroquímico de la célula en reposo). A este último gasto energético del gradiente de  $\text{Na}^+$  se acoplan los transportes secundarios que participan en la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^+$  (NCX, NHE, mNCX). Además, la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  a la TnC es exotérmica. La fracción de calor vinculada a todos estos eventos del ciclo de contracción-relajación se denomina “calor activo”, y posee los componentes dependiente e independiente de tensión (Gibbs y col., 1988; Ponce-Hornos y col., 1995). Por otra parte, cuando el corazón está en su fase diastólica también libera un flujo de calor denominado “flujo de calor de reposo” que depende de la actividad basal metabólica para mantener el gradiente iónico de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  en ausencia de contracción (Gibbs, 1979). Es posible comparar el flujo de calor medido con el equivalente energético para la hidrólisis y resíntesis del ATP a partir de su entalpía (80 kJ/mol de ATP) (Gibbs, 1979). La actividad mitocondrial, asociada al metabolismo aeróbico, es una parte importante del flujo de calor

miocárdico, tanto en reposo como durante la actividad contráctil estacionaria, debido a que el corazón debe resintetizar continuamente el ATP consumido en su ciclo. Por ello ese flujo de calor se asocia al metabolismo aeróbico acoplado a la fosforilación oxidativa ( $F_1F_0$ ATP-sintasa para la resíntesis de ATP). Pero también existe una fracción de calor asociada al metabolismo necesario para mantener el gradiente electroquímico mitocondrial y los movimientos de calcio a través de la membrana interna mitocondrial, que en ciertas situaciones puede desacoplarse de la fosforilación oxidativa (Consolini y col., 1997). Por ello en situaciones de sobrecarga de calcio mitocondrial como en la I/R se produce un aumento importante en el flujo de calor total con una reducida fuerza contráctil (Consolini y col., 2007). Las mitocondrias pueden controlar su nivel de  $Ca^{2+}$  intramitocondrial para regular la actividad enzimática metabólica y adaptarla a la demanda citosólica (Gunter y col., 2000). El mantenimiento de la  $[Ca^{2+}]_m$ , regulada por la captación mediante el uniporter de calcio (UCam) y la extrusión de  $Ca^{2+}$  por el mNCX, genera un gasto energético metabólico cuyo equivalente es 477 kJ/mol oxígeno (Curtin y Woledge, 1978). Considerando que se mueven 12  $H^+$  por  $O_2$  y 1  $Ca^{2+}$  por cada 2  $H^+$ , el equivalente energético es de unos 79.5 kJ/mol de  $Ca^{2+}$  movilizado en las mitocondrias. Así, a través del  $Ca^{2+}$  las mitocondrias regulan indirectamente la actividad metabólica asociada a la demanda cardíaca (Kiriazis y Gibbs, 2000). En contraste, bajo condiciones de sobrecarga de  $Ca^{2+}$  tales como las inducidas por hipoxia severa o isquemia prolongada, los transportadores de  $Ca^{2+}$  mitocondriales pueden contribuir a la injuria celular por activación del

poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) y pérdida de sustratos.

La energética juega un rol esencial en el daño postisquémico, y la metodología que la estima es muy sensible para detectar alteraciones durante la I/R. El miocardio debe resintetizar continuamente el ATP consumido en el mantenimiento de la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$  y en la contracción durante el mismo ciclo cardíaco, a partir del metabolismo aeróbico mitocondrial, exotérmico y claramente deficiente en la isquemia. Por ello, la calorimetría es una metodología válida para evaluar la energética cardíaca, y las alteraciones de diversa magnitud en los procesos de isquemia y de recuperación contráctil y funcional del corazón (Gibbs, 1979; Gibbs y col., 1988; Ponce-Hornos y col., 1982). El sistema calorimétrico de flujo para corazones enteros (de rata, ratón o cobayo) permite la evaluación simultánea de contractilidad y flujo de calor continuamente, tanto durante la perfusión, como en el cese de la misma (isquemia) y la reperfusión. El corazón aislado perfundido es un modelo *ex vivo* que permite evaluar la respuesta integral del órgano a la isquemia, condición imposible de mimetizar con preparaciones más simples, como trabéculas, papilares o cardiomiocitos aislados. Es posible estimar el flujo de calor total continuamente, ya sea previo a la isquemia o durante ella y en la reperfusión, considerando los diferentes factores de calibración del equipo, o conversión de la señal eléctrica registrada (en mVoltios) ante una potencia constante en flujo de calor (en mWatts o mJoules/s), estimados en presencia y en ausencia de perfusión. En estos protocolos se registra el flujo de calor total (Ht, en mJ/s/g), y no es posible registrar el flujo de calor de reposo (Hr) porque éste



también varía con la I/R. En consecuencia, no es posible calcular la energía o calor activo (Ha en mJ/g) correspondiente sólo a la contracción. La energética medida como flujo de calor total, combinada con herramientas farmacológicas para bloquear o estimular ciertos transportadores celulares, permiten evaluar la participación de los sistemas *in situ* en condiciones funcionales fisiopatológicas como la I/R.

## **Vías que conducen a la cardioprotección frente al daño isquémico**

Si bien muchas vías celulares participan en la cardioprotección en I/R, se describen aquellas que fueron evaluadas en esta Tesis.

### **Rol de la PKC (Proteína quinasa C)**

La proteína quinasa C (PKC) fue la primera quinasa estudiada en detalle en los modelos de I/R y protección del daño cuando se realizaba el preconditionamiento isquémico (PC), consistente en la aplicación de breves episodios isquémicos repetidos antes de la isquemia prolongada. Existen isoformas de la PKC: dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ),  $\text{Ca}^{2+}$  independientes ( $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\delta$  y PKC $\epsilon$ ) y atípicas o independientes del diacilglicerol (DAG) (Armstrong, 2004). La translocación de las varias PKC a la membrana inducida por isquemia fue determinada por ensayos de actividad de proteína quinasa en varias especies. El rol de la PKC en la cardioprotección se evidenció a través de ensayos con inhibidores selectivos en el modelo de PC (Simkovich y col., 1998; Liu y col., 1994). La contribución de la isoenzima PKC $\epsilon$  resultó ser la más importante en la cardioprotección frente a la I/R, ya que incrementó la función cardíaca y disminuyó el tamaño del infarto (Inagaki y col., 2003]. Además, ratones knock-out de PKC $\epsilon$  perdieron la cardioprotección, no así con otras isoenzimas (Saurin y col., 2002). Se encontró que la translocación de la PKC $\epsilon$  ocurre durante la isquemia pero no durante la reperfusión (Albert y Ford, 1999).

La activación de la PKC $\epsilon$  tiene un rol importante en la cardioprotección según ha sido demostrado en muchos estudios. Es variable la vía de

activación de la PKC, encontrándose interacciones con otras quinasas. Por ejemplo la wortmanina (selectivo inhibidor de la fosforilación de PI3K/Akt) bloqueó la translocación en el PC, lo que sugiere que la PKC $\epsilon$  es activada por la vía de PI3K (Tong y col., 2004). Por otro lado, la PKC también fue activada por donores de óxido nítrico, NO (Ping y col., 1999). El NO contribuye a la nitración de tirosina y activación de la PKC $\epsilon$  (Balafanova y col., 2002). Por otra parte, se describió que la eNOS puede ser fosforilada y activada por Akt, lo que también sugiere que la activación de la PKC $\epsilon$  sería posterior a la del PI3K (Tong y col., 2000). Es conocido que el NO también activa a la guanilato-ciclasa (GC) la cual a su vez puede activar a la PKC $\epsilon$  mitocondrial (Costa y col., 2005). Además, la PKC $\epsilon$  parece ser activada por los ROS generados durante los breves ciclos de I/R en el caso del PC (Baines y col., 1997).

Los blancos de la PKC $\epsilon$  que podrían mediar la cardioprotección son: la formación de un complejo de señalización mitocondrial localizado con proteínas quinasas mitógenas (MAPKs) (Costa y col., 2005); aumento de la fosforilación de la ERK mitocondrial; y fosforilación de la proteína VDAC del mPTP (Baines y col., 2002), aunque el efecto funcional de esto no ha sido explorado. La PKC es capaz de activar a los canales mitocondriales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP (mKATP) (Liu y col., 1996). Éstos han sido co-purificados juntos, sugiriendo que están asociados en un complejo de señalización mitocondrial (Andrukhiv y col., 2006). El flujo de K<sup>+</sup> fue reducido por fosfatasas sugiriendo que la fosforilación por PKC es la que activa a los canales mKATP, mediante fosforilación de residuos de serina y treonina (Murphy y Steenbergen, 2008). Esto causa el ingreso de K<sup>+</sup>, que

disipa el gradiente mitocondrial con la consecuente disminución de la entrada y sobrecarga de calcio durante la reperfusión. De esta forma, se previene la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), que causa la pérdida del citocromo C, creatina-quinasa y otras proteínas mitocondriales que disparan la apoptosis celular (Halestrap y Brenner, 2003; Di Lisa y Bernardi, 2006). En esta tesis, para evidenciar si las PKC participan en la cardioprotección se utilizó celeritrina, un inhibidor isoenzima no-selectivo de las PKC (Lu y col., 2001).

### **Rol de los canales mitocondriales de potasio dependientes de ATP (mKATP)**

El canal mKATP está involucrado en la regulación del volumen de la matriz mitocondrial, de forma secundaria a la entrada obligada de agua que acompaña el flujo neto de  $K^+$  y aniones (Kowaltowski y col., 2001). Costa y col. (2006) mostraron que el influjo de  $K^+$  fue aumentado por diazóxido e inhibido por ATP, además de que tanto el diazóxido como la valinomicina (ionóforo de  $K^+$  desacoplante) causaron alcalinización de la matriz e hinchamiento o “swelling” (Garlid y col., 1997). El hecho de que los canales mKATP regulan el volumen mitocondrial bajo condiciones fisiológicas sugirió que éstos podrían tener una función importante en la I/R (Liu y col., 2010). Durante la isquemia, la matriz se contrae debido a la reducción de su  $\Delta\Psi_m$ , lo cual causa recíproca expansión del espacio intermembrana y afecta a la  $F_1F_0$ ATP-sintasa. En cambio, la apertura de los mKATP aumenta la conductancia al  $K^+$  para mantener el volumen de la matriz y del espacio intermembranoso, y reduce la hidrólisis del ATP por la  $F_1F_0$ ATP-sintasa

mitocondrial en la isquemia, preservando el ADP para la reperfusión (Dos Santos y col., 2002; Costa y col., 2006; Liu y col., 2010) y la excesiva carga de  $\text{Ca}^{2+}$  de la mitocondria. Mientras el diazóxido abre a los canales mKATP, el ácido 5-hydroxidecanoato (5-HD) lo inhibe (O'Rourke, 2004). En el preconditionamiento, el canal mKATP es activado por NO y PKC $\epsilon$ ; sugiriendo que el NO activa la GC la cual conduce a la activación de la PKC $\epsilon$  que es la que fosforila y así activa a los canales mKATP, conduciendo a la cardioprotección (Xu y col., 2002), pero ésta es inhibida por el 5-HD. Como se explicó anteriormente, la protección por activación de los mKATP en la I/R es debida a que reduce la captación y sobrecarga mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  en la reperfusión, que podrían conducir a la apertura del mPTP y disparar los mecanismos de muerte celular (Murata, 2001). Además, la activación de los canales mKATP podrían liberar una pequeña cantidad de ROS (Pain y col., 2000) que reforzaría la activación de la PKC $\epsilon$  y por lo tanto amplificaría las señales de cardioprotección. Considerando que la maca posee isoflavonas, y que una de ellas, la genisteína demostró activar a los mKATP (Colareda y Consolini, 2018; Colareda y col., 2020), se evaluó su rol inhibiéndolos con 5-HD en esta tesis.

### **Rol de la NO-sintasa (eNOS)**

La oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) sintetiza NO, un importante mediador de la cardioprotección (Jones y Bolli, 2006). La producción de NO por la eNOS, puede ser activada por la Akt que fosforila a la eNOS. Además, durante la isquemia con bajo pH intracelular y bajo oxígeno, el NO puede

también ser generado a partir del nitrito por la desoximioglobina o la xantina oxidoreductasa (Duranski y col., 2005; Li y col., 2001; Shiva y col., 2007). El nitrito reduce el daño por I/R (Duranski y col., 2005). Sin embargo, se ha descrito que el NO ejerce dos funciones opuestas en la disfunción isquémica cardíaca dependiendo de su concentración. Altos niveles de NO producidos por la NO-sintasa inducible (iNOS) promueven la apoptosis, mientras los bajos niveles de NO producidos por la isoenzima endotelial (eNOS) mejoran la cardioprotección (Razavi y col., 2005).

La eNOS produce NO y este incrementa la actividad del canal mKATP (Sasaki y col., 2000). Se ha encontrado que los efectos del NO en el mKATP son mediados por la proteína quinasa G (PKG) y la PKC $\epsilon$ . La eNOS genera NO, el cual activa a la GC, el GMPc generado activa a la PKG y ésta a su vez activa a la PKC $\epsilon$  mitocondrial, resultando en la fosforilación y apertura de los canales mKATP (Costa y col., 2005). También el NO puede realizar modificaciones post-traduccionales de proteínas por S-nitrosilación. La S-nitrosilación es reversible y puede proteger grupos tiol de la oxidación por ROS, y por lo tanto protege del daño por I/R. La S-nitrosilación puede alterar la actividad de enzimas y transportadores. El NO también S-nitrosila al complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Burwell y col., 2006). En la isquemia-reperfusión, la inhibición del complejo I puede reducir el daño isquémico por ser productor de ROS (Chen y col., 2007). La inhibición del complejo I reduce la activación del mPTP (Fontaine y col., 1998), aunque parece ser perjudicial si se inhibe por mucho tiempo. Otro efecto de la S-nitrosilación por NO es inhibir el canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L (Sun y col., 2006), el cual reduciría la excesiva entrada de Ca<sup>2+</sup> durante la isquemia. Estos efectos

de inducción de eNOS y S-nitrosilación son mayores en el género femenino que en el masculino, y son activados por los estrógenos actuando en sus receptores genómicos beta y no-genómicos (GPCR) (Sun y col., 2006; Shao y col., 2016). Además, el NO inhibe la liberación mitocondrial de citocromo C al citosol, a través del mPTP (Razavi y col., 2005). El citocromo C en el citosol forma parte del llamado aparato apoptosoma, que activa la vía de las caspasas y que lleva a la célula a la apoptosis (Green y Reed, 1998). El NO también disminuye la apertura del mPTP vía despolarización de la membrana e inhibición de la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Brookes y col., 2000; Razavi y col., 2005). Considerando que la maca posee isoflavonas, que pueden actuar como fitoestrógenos, y que estas hormonas activan la vía de la NOS, en esta tesis se evaluó el rol de la NOS con L-NAME, un inhibidor de las varias isoenzimas de NOS (Fukumoto y col., 2013).

### **Rol del intercambiador sodio por calcio mitocondrial (mNCX)**

La captación de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria ocurre vía el uniporter mitocondrial de calcio (UCam), el cual usa la energía del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Durante la isquemia, se inhibe el transporte de electrones por lo que se espera que la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria disipe el  $\Delta\Psi_m$  y posteriormente limite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Por otro lado, el  $\text{Ca}^{2+}$  es extruido de la mitocondria en el intercambio por  $\text{Na}^+$  (mNCX) (Crompton, 1990; Cox y Matlib, 1993; Gunter y col., 1994). El nivel de  $\text{Na}^+$  de la matriz es regulado por el NHE mitocondrial y así también el gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna. En la

mitocondria energizada, el gradiente de  $\text{Na}^+$  es dirigido hacia adentro directamente y la  $[\text{Na}^+]_i$  es menor en la matriz (Donoso y col., 1992). Durante la isquemia hay un pequeño incremento mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  que es inhibido por clonazepam (un inhibidor del mNCX) lo que sugiere que el mNCX opera en el modo reversa para incrementar el  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial (Griffiths y col., 1998). Esto sugirió que el gradiente de  $\text{Na}^+$  disminuye como resultado de la caída en el gradiente de pH y por lo tanto se reduce la entrada a favor del gradiente de  $\text{Na}^+$ , sólo un aumento en el  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , podría contribuir a la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro de la mitocondria por el mNCX. Sin embargo, el clonazepam incrementó la  $[\text{Ca}^{2+}]$  mitocondrial durante la reperfusión, sugiriendo que cuando el gradiente de pH mitocondrial y el gradiente de  $\text{Na}^+$  son restaurados, el mNCX extrude  $\text{Ca}^{2+}$  desde la mitocondria (Griffiths y col., 1998). Se ha sugerido que el tratamiento pre-isquémico con clonazepam prevendría la disfunción por reducir la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol durante la reperfusión, el cual contribuye a la contractura diastólica (Cox y Matlib, 1994). Por otra parte, se ha encontrado mejoría de la recuperación post-isquémica por clonazepam en un modelo de atontamiento severo en rata. Sin embargo, en situación de mayor recuperación postisquémica como es en el hipotiroidismo, el clonazepam redujo la cardioprotección dado que el aumento de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial disparó la apertura del mPTP (Ragone y col., 2020). En esta tesis se evaluó el rol del mNCX en la cardioprotección de la maca, inhibiéndolo con clonazepam.



## **Flavonoides en la fisiopatología de la isquemia y reperfusión**

Todas las plantas poseen en su composición química metabolitos secundarios polifenólicos que tienen efectos sobre la salud. Se calcula que la ingesta diaria de flavonoides sería aproximadamente entre 50 y 800 mg/día y que podrían tener una función protectora ante las enfermedades cardiovasculares y coronarias (Pietta, 1999 y 2000). Se sabe que los flavonoides tienen una buena capacidad antioxidante ya que pueden atrapar radicales libres (que desencadenan procesos inflamatorios y oxidaciones) y quelar metales con un bajo potencial rédox. El grado de actividad antioxidante depende de la estructura química. Por ejemplo, los flavonoles con un grupo catecol en el anillo B son más antioxidantes que las correspondientes flavonas. También se sabe que la glucosilación de los flavonoides disminuye la actividad antioxidante. Estas propiedades antioxidantes son las que pueden justificar sus acciones vasodilatadoras y vasoprotectoras, así como las acciones antitrombóticas, antilipídémicas, antiateroscleróticas, antiinflamatorias y antiapoptóticas (Quiñones y col., 2012).

Los flavonoides como silimarina, taxifolina y quercetina protegen a las mitocondrias y a los microsomas de la peroxidación lipídica (Middleton y Kandaswami, 1994).

Los flavonoides presentan actividad antiinflamatoria por inhibir la peroxidación del ácido araquidónico. Además, inhiben la catecol O-metiltransferasa (COMT) y por consiguiente la duración de la acción de las

catecolaminas se encuentra prolongada (Bruneton, 1991; Martino y col., 2000).

También, los polifenoles pueden modular la actividad de diferentes enzimas, interfiriendo en sus mecanismos de señalización y procesos celulares. Por ejemplo, las antocianinas delfindin-3-O-sambubiósido y cianidin-3-O-sambubiósido de *Hibiscus sabdariffa* han demostrado una capacidad inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que justificaría sus efectos vasodilatadores y cardioprotectores (Ojeda y col., 2010).

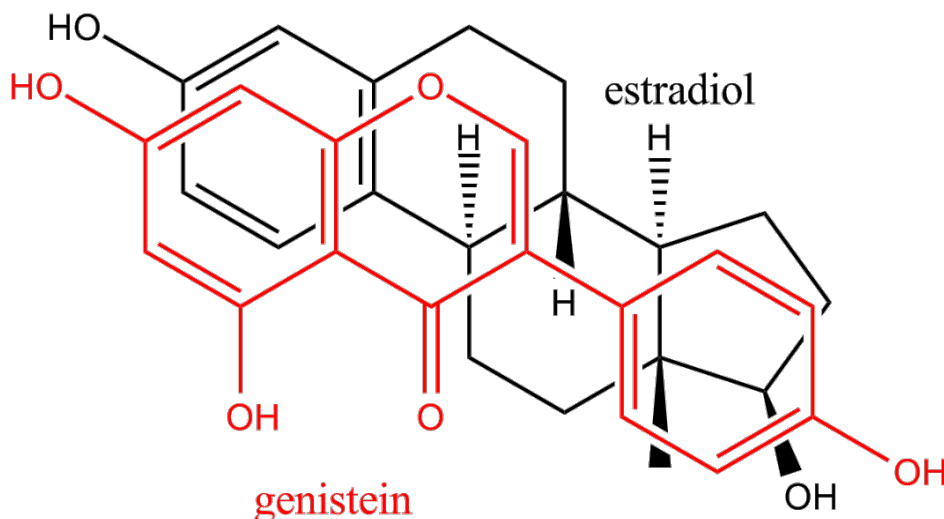
Los flavonoides tienen un efecto vasodilatador mediado por la producción de óxido nítrico (NO), que suele ser dependiente del calcio activador de la NO-sintasa. Se ha demostrado que el resveratrol y la quercetina inducen un incremento de la concentración intracelular de calcio en las células endoteliales por inhibición de canales de  $K^+$  o por inhibición de las  $Ca^{2+}$ -ATPasas del retículo endoplasmático (Martín y col., 2002). El elevado nivel de calcio endotelial activa a la eNOS.

Además los flavonoides demostraron ser cardioprotectores en la I/R con mecanismos tales como bloqueo del influjo de calcio, activación de los canales de K mitocondriales y estimulación del metabolismo, los cuales conducen a la reducción de la sobrecarga de calcio mitocondrial (Testai, 2015).

Por otro lado, las isoflavonas poseen una estructura similar a la de los estrógenos (Figura 7), por lo que pueden unirse a los receptores de estrógenos. Se ha registrado una unión de isoflavonas como genisteína a los

receptores estrogénicos alfa y beta genómicos y al no genómico GPCR (Suetsugi y col., 2003). Debido a esto se clasifican como fitoestrógenos.

*Figura 7: Comparación de la estructura de estradiol con la estructura de genisteína. Imagen realizada con el programa ChemDrawUltra10.0.*



### **Metabolismo de las isoflavonas**

Las isoflavonas principales son daidzeína y genisteína, y se encuentran ya sea como aglicona (forma no-conjugada) o como diferentes tipos de conjugados glucósidos. Éstos incluyen 6"-O-malonilglucosidos, 6"-O-acetilglucosidos, y los beta-glucósidos de daidzeína y de genisteína (Farmakalidis y Murphy, 1985). Las formas conjugadas son inactivas: genistina, daidzina y glicitina, acetildaizida, acetilglicitina, malonilgenistina, malonilidisisina, y malonilglicitina. Estas formas inactivas glucosiladas tienen baja biodisponibilidad y son poco activas en nuestro organismo.

Los conjugados glucosídicos individuales de las isoflavonas son fácilmente hidrolizados por las bacterias intestinales (Setchell y col., 1984).

Las enzimas  $\beta$ -glucosidasas (glucósido hidrolasas) son las encargadas de hidrolizar a los glucósidos inactivos en el intestino delgado, los cuales son liberados de su forma conjugada y transformados en agliconas (genisteína, daidzeína y gliciteína) que son las formas más activas de las isoflavonas. Las agliconas mayoritarias de isoflavonas son la daidzeína (proveniente de la daidzina) y la genisteína (proveniente de la genistina).

La daidzeína aún podrá ser metabolizada en S-equol y 5-hidroxi equol por la microbiota intestinal (Figura 8). Estos son los derivados que mejor se absorben en el intestino y a los que se atribuye la más alta actividad biológica. También se puede metabolizar en O-desmetilangolensina (O-DMA), una forma considerada inactiva (Figura 8).

La isoflavona equol fue observada incrementarse mucho en la excreción urinaria de varias especies animales y humanos que recibieron proteína de soja en su dieta (Braden, 1967; Axelson, 1984). Daidzeína 7-O-beta-D-glucósido fue aislado e identificado de la harina de soja, y puede convertirse a equol-glucuronido (Axelson, 1984). La biotransformación de los fitoestrógenos ocurrió por la microflora intestinal sobre los lignanos y los glucósidos de isoflavona dietarios (Kurzer, 1995). La administración de antibióticos abolió esa formación (Setchell, 1998). La incubación de la proteína vegetal con flora fecal humana cultivada resultó en la formación de equol (Setchell, 1984). El equol se halló en altas concentraciones en la sangre de vena portal de ratas y en la bilis, estableciendo la circulación enterohepática de las isoflavonas (Sfakianos y col., 1997). Estudios de la farmacocinética de genisteína en ratas confirmaron que al igual que los estrógenos, las isoflavonas sufren la secreción biliar (Sfakianos y col., 1997).

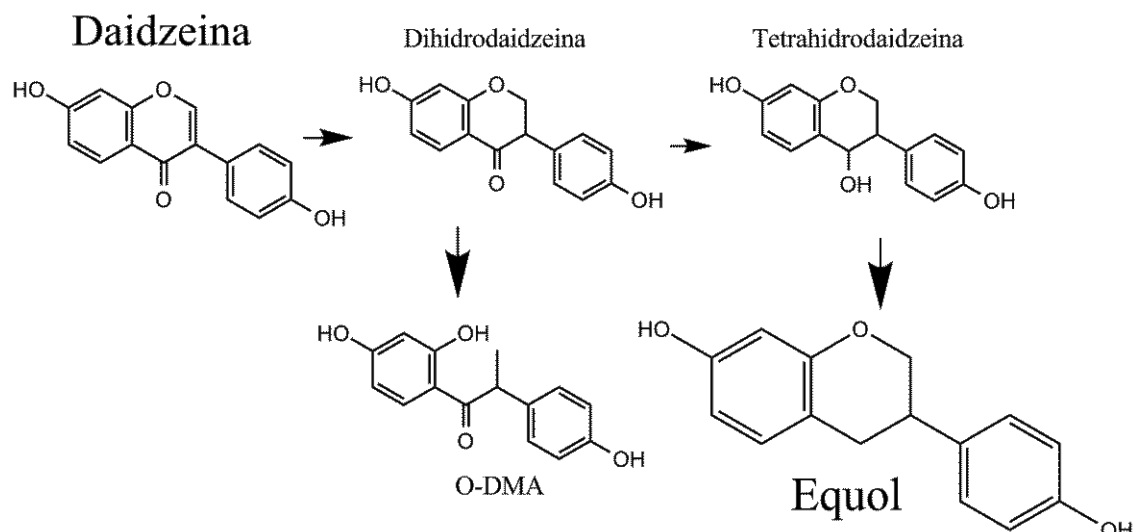
Las isoflavonas en plasma y orina están predominantemente conjugadas con ácido glucurónico y en menor extensión con ácido sulfúrico (Coward y col., 1996). La eficiencia de la conjugación de isoflavonas es alta, por lo cual circula una muy pequeña proporción de isoflavonas libres. Aparecen en la sangre venosa portal derivados como enterolactona, enterodiol, y equol predominantemente conjugados con ácido glucurónico (Axelson y Setchell, 1980), sugiriendo que la conjugación de isoflavonas puede ocurrir en la pared intestinal durante la absorción. Esto fue confirmado en las preparaciones de saco intestinal evertido de rata (Sfakianos y col., 1997). Por ello, se concluyó que la conjugación intestinal es el sitio principal de glucuronidación de las isoflavonas dietarias. La excreción de equol fue de 11 a 25 mmol/día (3 a 7 mg/día) después de la ingesta de 40 g de proteína vegetal de soja. Esto es varios órdenes de magnitud mayor que la excreción endógena de estrógeno.

Existe una alta variabilidad en la excreción urinaria de isoflavonas en humanos que consumen alimentos de soja (Kelly y col., 1993). Esto parece ser debido a que un 30% de los sujetos fueron incapaces de biotransformar daidzeína a equol (Setchell, 1984). Una relación inversa existe entre la excreción de equol y daidzeína y O-desmetilangolensina (Figura 8), los metabolitos de daidzeína (Bannwart y col., 1984). La transformación metabólica de las isoflavonas dietarias es compleja, e incluye varios metabolitos difenólicos intermediarios de daidzeína y genisteína.

La flora intestinal humana puede degradar el núcleo de isoflavona a fenoles más simples. En ovejas, el p-etilfenol es el metabolito cuantitativamente más importante de genisteína (Lindsay y Kelly, 1970). Las

concentraciones plasmáticas de daidzeína, genisteína, equol, y desmetilangolensina fueron relativamente bajas. En administración aguda de soja las concentraciones en plasma de daidzeína, genisteína, y equol se incrementaron hasta valores de 0.08 a 2.4 mmol/l (20 a 600 ng/ml) (Coward y col., 1996). Enterolactona, enterodiol, y equol estuvieron presentes principalmente como conjugados glucurónidos y algo menos como sulfatos (Axelson y Setchell, 1980). Las concentraciones de isoflavonas no conjugadas fueron relativamente bajas.

*Figura 8: Daidzeína y el metabolismo intestinal al compuesto más activo Equol y al compuesto inactivo O-DMA. Imagen realizada con el programa ChemDrawUltra10.0.*



## **Efectos de los metabolitos de isoflavonas**

El equol fabricado en el intestino tiene efectos estrogénicos porque tiene gran afinidad por el receptor beta estrogénico (ER- $\beta$ ), y a la vez, también tiene efectos antiandrogénicos enlazándose a la dihidrotestosterona (DHT) (Setchell y col., 2005). El equol tiene una vida media más larga, es más biodisponible que las agliconas y aporta el mayor efecto antioxidante de las isoflavonas. Entre los efectos benéficos a nivel cardiovascular del S-equol se describen: efecto antioxidante, efecto antiinflamatorio por su afinidad con el ER- $\beta$  y modula la actividad de los factores de transcripción inflamatorios (NFKappa-beta), reducción del riesgo a sufrir enfermedades cardiovasculares, aumento del metabolismo de los estrógenos (aumento de los 2-OH-estrógenos y disminución de los 4-OH y 16 $\alpha$ -OHE1).

Las enzimas de la microbiota intestinal que hidrolizan las isoflavonas y transforman las formas glucosiladas conjugadas inactivas (genistina, daidzina y glicitina) en las formas agliconas activas (genisteína, daidzeína y gliciteína) son las  $\beta$ -glucosidasas, producidas sólo por ciertas bacterias intestinales. También son producidas de forma natural por diferentes plantas, y están presentes en la soja, las almendras o en las semillas de la manzana. Estas enzimas son la clave para que las isoflavonas puedan ser activas y protectoras de la salud.

Por otro lado, las isoflavonas genisteína y glicitina son capaces de cambiar la composición de la microbiota, mejorándola y aumentando las *Bifidobacterium spp.*, y reduciendo la concentración de los Clostridiaceae que pueden provocar diferentes patologías en los humanos. Las dietas que

incluyen más fitoestrógenos ayudan a combatir patologías cardiovasculares. Los componentes fenólicos como las isoflavonas son metabolizados por la microbiota intestinal en componentes más activos y saludables.

Entre las bacterias implicadas en el metabolismo de las agliconas de isoflavonas por tener altos niveles de actividad  $\beta$ -glucosidasa se encuentran las bacterias ácido-lácticas de los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, y las bifidobacterias (Yeo y Liong, 2010). Todas pueden utilizarse para fermentar la soja porque son excelentes produciendo  $\beta$ -glucosidasas y por tanto, también son excelentes transformando las isoflavonas en las formas más biodisponibles y activas, las agliconas daidzeína, genisteína y especialmente el equol.

Gracias a estas especies bacterianas con actividad  $\beta$ -glucosidasa, la genisteína se absorbe rápidamente en el intestino delgado inalterada, mientras que la daidzeína se metaboliza dando lugar a un derivado con una actividad biológica aún más alta: el S-equol (Monteiro y col., 2017).

### **Isoflavonas en la fisiopatología de la isquemia y reperfusión**

En nuestro laboratorio se han estudiado las propiedades cardioprotectoras de la **genisteína**, una isoflavona de soja con actividad de fitoestrógeno. En corazones aislados de rata expuestos a modelos de atontamiento moderado y severo de I/R, se encontró que los efectos de genisteína difieren con el género, probablemente debido a la diferencia estrogénica endógena que es mayor en hembras que en machos. Además, los resultados diferían si la genisteína se perfundía (20  $\mu\text{mol/l}$ ) en los corazones



aislados antes de la I/R o se administraba vía oral. En el primer caso no se encontró cardioprotección, e incluso se observó inotropismo negativo a bajas temperaturas en corazones de rata macho (Colareda y col., 2016). En cambio, con la administración oral de 5 mg/kg (machos y hembras jóvenes) un día previo al aislamiento del corazón el efecto cardioprotector fue mayor en ratas adultas macho que en los de hembras (Colareda, tesis doctoral 2016). Esto ocurrió tanto en el modelo de atontamiento severo por isquemia de no-flujo y reperfusión (Colareda y col., 2020) como en el modelo de hipoperfusión y reperfusión (Colareda y Consolini, 2018). Por otra parte, la administración oral de 3 mg/kg genisteína en ratas hembra seniles (de más de 20 meses de edad) fue más cardioprotectora que en ratas hembra jóvenes (Colareda y col., 2020). Los resultados sugirieron una mayor efectividad de genisteína en situaciones de deficiencia estrogénica para prevenir el atontamiento cardíaco severo (reducida contractilidad post-isquémica con alto gasto energético que se traduce en una baja economía muscular). El mecanismo involucra la activación de la vía de la proteína-quinasa C (PKC) y de los canales de potasio mitocondriales (mKATP) (Colareda y col., 2020). Este mecanismo reduce la sobrecarga de calcio mitocondrial, lo cual previene la disfunción contráctil en el caso de ocurrir una obstrucción transitoria de la irrigación coronaria.

La maca (*Lepidium meyenii* Walp., Brassicaceae) posee metabolitos secundarios (Figura 5) que están siendo estudiados y que se cree que son los responsables de la actividad terapéutica. Como ya describí previamente, en la muestra comercial de harina de maca estudiada (Kallpa), se encontraron las isoflavonas genisteína, genistina (glucósido de genisteína) y daidzeína,

que podrían ser beneficiosas como resultó la genisteína en los modelos evaluados de isquemia y reperfusión cardíaca. Hay pocas evidencias acerca de si los fitoestrógenos ejercen efecto beneficioso a nivel cardíaco durante la I/R en la deficiencia estrogénica por senilidad.

## Hipótesis

Considerando la cardioprotección frente a la I/R obtenida con la isoflavona genisteína en ratas macho jóvenes y en hembras seniles (Colareda y col., 2020), y la actividad estrogénica general que fue reportada en la harina de maca o sus extractos (Valentová, 2006, Meissner, 2006), fue posible hipotetizar que:

- a) La administración oral de la harina de raíz de maca (*Lepidium meyenii*) podría generar un efecto cardioprotector similar al de genisteína.
- b) La cardioprotección de la maca podría ser mayor en una condición de deficiencia estrogénica, dada por el género o la senilidad.
- c) Los mecanismos cardioprotectores de la harina de maca podrían ser similares a los exhibidos por genisteína, por ser mayoritaria entre las isoflavonas de la maca.

## **Objetivos**

El objetivo general de esta Tesis fue evaluar los posibles efectos cardioprotectores del tratamiento oral con la harina de la raíz de maca (*Lepidium meyenii*) en la disfunción contráctil y energética (atontamiento severo) provocada por isquemia y reperfusión (I/R).

### **Objetivos específicos**

a) Estudiar el comportamiento mecánico-energético de los corazones aislados de rata (hembras vs machos) expuestos al atontamiento severo por I/R (sin infarto), frente a la administración oral de la harina de la raíz de maca (*Lepidium meyenii*).

b) Estudiar los posibles efectos cardioprotectores de la harina de la raíz de maca frente a la I/R en ratas seniles (de más de 20 meses de edad).

c) Evaluar los mecanismos de acción sobre la homeostasis de  $Ca^{2+}$  del tratamiento oral con maca en la recuperación de la disfunción por isquemia/reperfusión cardíaca.

## **Materiales y Métodos**

## **Material vegetal**

La harina de raíz de Maca (marca Kallpa) se adquirió en una dietética céntrica de la ciudad de La Plata, ubicada en diagonal 80 y 6.

La raíz de maca fue adquirida directamente del productor en el mercado “Modelo” de Huancayo perteneciente al Valle del Mantaro, Provincia de Junín, Perú y traída por la Dra. Luisa Tracy Carhuamaca Antezana que es oriunda de Huancayo, el 16 de abril de 2018. Posteriormente fue identificada por la Prof. Mg. Sc. Marta Colares.

Todos los estudios farmacológicos se efectuaron con la harina de maca (Kallpa).

## **Animales**

Se utilizaron ratas Sprague Dawley adultas del bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas de UNLP, y ratas Wistar adultas y seniles del bioterio del ININCA-Facultad de Medicina UBA-CONICET. Todas se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Exactas de UNLP bajo las normas de cuidado, uso, sujeción, anestesia y eutanasia aceptados internacionalmente (NIH 85-23, 1996 y 2010; Directiva de la Unión Europea para Experimentos en Animales, 2010/63/EU). Todos los procedimientos fueron aprobados por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Exactas de UNLP en el protocolo 015-05-15 presentado por la Dra. Alicia E. Consolini.

## **Análisis de la materia prima**

### **Análisis del rótulo de la materia prima**

Se llevó a cabo un análisis de rótulo de la materia prima de la droga vegetal “Harina de maca 100% pura, marca Kallpa” proveniente de Perú. Se buscó la información presente en el envase, se correlacionó con una búsqueda a partir de esa información y las omisiones importantes en la descripción del producto.

### **Características micrográficas de la materia prima**

Se realizó un análisis al microscopio óptico de los almidones presentes en la materia prima (harina de maca marca “Kallpa”). Esto permite identificar la muestra y posibles adulterantes. El extendido de la harina de maca sobre el portaobjetos fue teñido con solución de Lugol para identificar los almidones. También se realizó un extendido de la raíz de maca traída de Perú y otro de poroto de soja, para descartar la presencia de la misma.

Los preparados fueron observados con el microscopio óptico Leitz SM-LUX a 400x, y se tomaron imágenes con una cámara con un sensor CMOS de Sony de 13 MPX -IMX214 con una óptica focal fija con rango de apertura f/2.0.

## **Preparaciones biológicas para estudio farmacológico**

### **Corazones arterialmente perfundidos**

Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital (60 mg/kg), heparinizadas (2000 UI por vía I.P. con aguja 21Gx15mm), y a continuación se les inyectó tramadol (10-20 mg/kg S.C. con aguja 21G 0.8x25mm) para analgesia. Luego de detectar la pérdida de reflejos y del tono muscular esquelético, se extirpó el corazón rápidamente, se canuló y retroperfundió por vía arterial según la técnica de Langendorff a flujo constante. La perfusión se realizó con solución Krebs a 8 ml/min/g regulado por una bomba Gilson, flujo con el cual no se registra edema en el preparado (Dhein, 2005). Se eliminaron las aurículas y los focos en tabique de actividad espontánea, y se colocó un globo de volumen regulable en el ventrículo izquierdo conectado a un transductor de presión para registrar la presión intraventricular isovolumétrica (P).

Luego el preparado fue introducido en la cámara interna de un calorímetro (Figura 9) que permite la medición continua de la generación de calor por el tejido (Ponce-Hornos y col., 1982; Ponce-Hornos y col., 1995). Se trabajó a temperatura constante (37°C). Una vez dentro del calorímetro se procedió a la medición continua del calor liberado y la presión ventricular izquierda (Figura 10), mientras que los ventrículos se estimularon eléctricamente con pulsos de 5 a 8 V con una duración de 9 a 12 ms, y una frecuencia de 3 Hz, para evitar la actividad espontánea, por medio de dos



electrodos conectados a un estimulador eléctrico (Letica 12406, Barcelona, España).

Bajo estímulo estacionario se detecta la presión intraventricular izquierda, y se ajusta el volumen del globo intraventricular en pasos de 0.1 ml, hasta alcanzar la más alta máxima presión desarrollada en la contracción (P). Luego del período de estabilización control y, para el estudio del posible mecanismo, se efectuaron intervenciones farmacológicas en la perfusión durante 15 minutos. Luego la perfusión fue suspendida durante 30 minutos (isquemia severa), pasados los cuales se reperfundió nuevamente a 8 ml/min/g durante 45 minutos con solución Krebs.

Las condiciones experimentales fueron empleadas en trabajos previos (Consolini y col., 2007; Ragone y Consolini, 2009; Ragone y col., 2015; Colareda y col., 2016; Ragone y col., 2020; Colareda y col., 2020).

La señal de voltaje del transductor de presión Gould Statham P23 (Oxnard, California, USA) fue amplificada y simultáneamente digitalizada por un sistema PowerLab 2/26 (AD Instruments, Bella Vista, New South Wales, Australia) como LVP (Figura 10) luego de ser calibrada en mmHg con un manómetro de mercurio y aplicación de una presión conocida. Luego del experimento, se calcularon la máxima presión desarrollada en la contracción (P), las velocidades máximas de contracción (+dP/dt) y de relajación (-dP/dt) a partir de la primera derivada del registro de presión, y la contractura diastólica como diferencia respecto de la presión diastólica inicial o preisquémica ( $\Delta$ LVEDP). Los tiempos totales de contracción también fueron calculados (TT). Las P también fueron expresadas como porcentaje de la P inicial para comparar la recuperación postisquémica de todos los protocolos.

## **Microcalorimetría del corazón aislado perfundido**

El calorímetro de flujo (Figura 9) es un cilindro compacto de cobre, buen conductor del calor, que contiene dentro de la cámara 2 unidades cerámicas termosensibles Peltier (Melchor Thermoelectrics, Trenton, NJ, USA) de 127 termocuplas cada una conectadas en serie. Éstas registran la diferencia de temperatura entre el interior de la cámara (en contacto con el músculo) y el exterior de la misma (mantenido a temperatura constante por el baño termostatzado a  $37 \pm 0.01^\circ\text{C}$ ). Esta señal permite la medición del flujo de calor de los corazones enteros de rata en perfusión o en isquemia. La temperatura fue ajustada a través de tres baños conectados en paralelo, uno con el regulador de temperatura tipo Lauda; el segundo baño con agua para calefaccionar las soluciones y la bomba para impulsar el agua por las serpentinas a los otros dos baños; y el tercero con el calorímetro sumergido, todos cerrados (Ponce-Hornos y col., 1982; Ponce-Hornos y col., 1995; Consolini y col., 2007). La señal de voltaje emitida (en mV) es amplificada y simultáneamente digitalizada por el sistema PowerLab 2/26 (Ht en la Figura 10). Se obtuvieron líneas de base calorimétricas en ausencia del corazón, antes y después del experimento, con perfusión y con el corte de perfusión. Estas líneas serán restadas del valor total liberado por el corazón, respectivamente en presencia de la perfusión y en isquemia.

La calibración de la señal se realizó por aplicación de una potencia eléctrica constante por debajo del límite de estimulación del músculo (2 mW, < 1 volt, a 2 kHz) en el ventrículo al final del experimento, con y sin flujo de perfusión, y se obtuvieron los factores de calibración tanto para la isquemia

como para la presencia de perfusión (en  $\text{mW/mV}$ ). Los factores se utilizaron para expresar el flujo de calor en  $\text{mW}$  ( $\text{mJ/s}$ ). Luego del experimento, el preparado se pesó y el valor obtenido se utilizó para calcular el flujo de calor total (Ht) en  $\text{mW/g}$ . Para comparar los protocolos, el Ht fue expresado en porcentaje del Ht inicial.

El Ht se relacionó con los cambios simultáneos de P antes y durante toda la I/R, por lo que se calculó la economía muscular como la relación  $P/\text{Ht}$  ( $\text{mmHg.g/mW}$ ) y se expresó como porcentaje de la economía inicial para que sean comparables los experimentos.

*Figura 9: Calorímetro de flujo. Izquierda, esquema del dispositivo. Derecha, foto mostrando el ventrículo perfundido, con la cánula intraventricular para medir la fuerza de contracción isovolumétrica y los electrodos para estimulación eléctrica.*

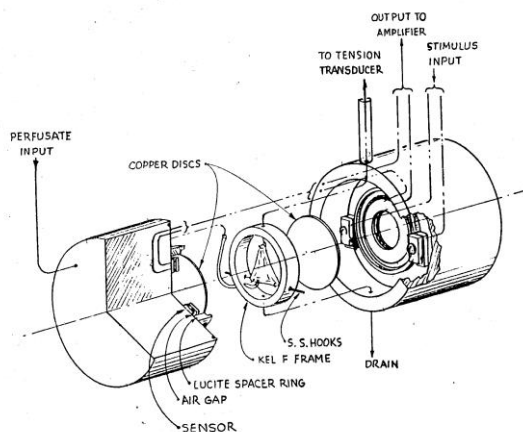
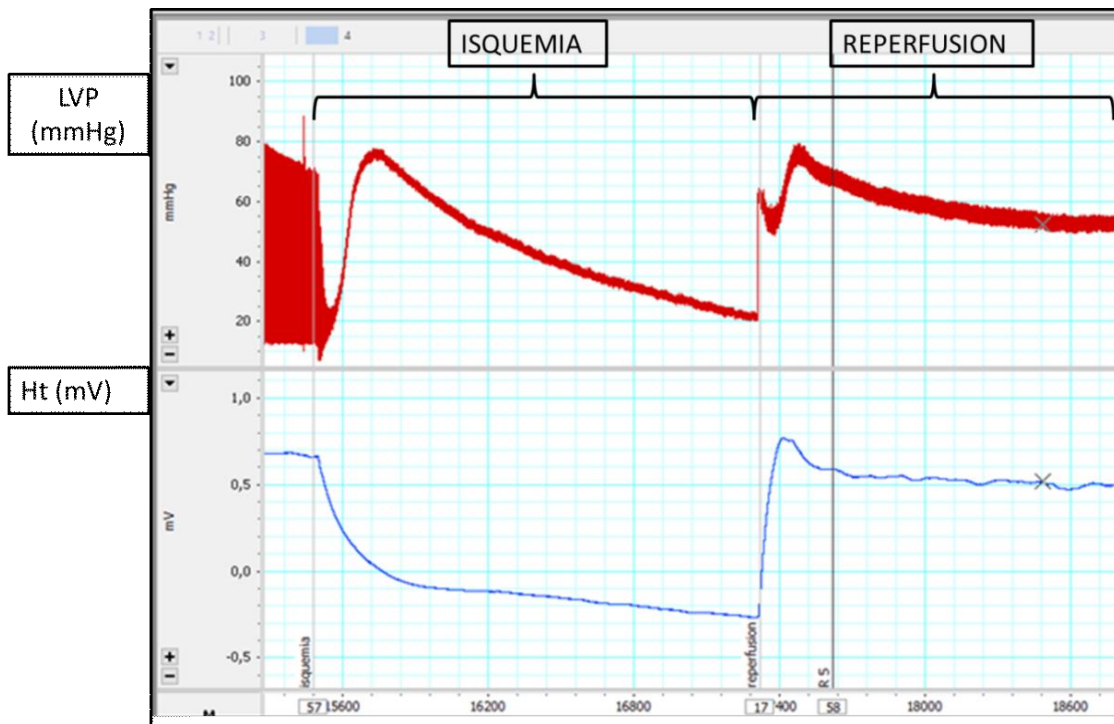


Figura 10: Gráfico obtenido del protocolo de estabilización, isquemia y reperfusión de un ventrículo aislado de rata estimulado a 3 Hz, a 37°C. Arriba la presión desarrollada del ventrículo izquierdo (LVP, mmHg). Abajo la señal para calcular el simultáneo flujo de calor liberado (Ht, mV).



## **Aislamiento de cardiomiocitos**

Los cardiomiocitos fueron aislados de corazones de rata, obtenidos por el método previamente descrito (Consolini y col., 2011; Ragone y col., 2015). Brevemente, los corazones fueron colocados en el sistema de Langendorff, perfundidos con solución Krebs- HEPES libre de  $\text{Ca}^{2+}$  por 5 minutos, luego cargados con Krebs- HEPES con  $50 \mu\text{mol/l}$   $\text{CaCl}_2$  con  $0.1 \text{ mg/ml}$  de colagenasa P (Roche) y  $0.02 \text{ mg/ml}$  de proteasa XIV (Sigma) por 13 minutos. A continuación, las enzimas se lavaron con solución Krebs- HEPES  $50 \mu\text{mol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$  por 5 minutos. La perfusión fue burbujeada constantemente con  $\text{O}_2$  y termostatizada a  $35\text{-}37^\circ\text{C}$ . Finalmente los ventrículos fueron removidos y desmenuzados, agitados en solución por 10 minutos, colados, elevado gradualmente el  $\text{Ca}^{2+}$ , y almacenados en solución salina buffer HEPES con  $1 \text{ mmol/l}$   $\text{Ca}^{2+}$  para la carga de fluoróforo y evaluación.

## **Microscopía confocal**

Los cardiomiocitos de rata fueron cargados con  $12 \mu\text{mol/l}$  Fluo-4 AM (Molecular Probes/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) por 15 minutos a  $37^\circ\text{C}$  y lavados por otros 15 minutos, para detectar la señal de calcio libre en el citosol. Otro grupo de cardiomiocitos fue cargado por 1 hora a  $4^\circ\text{C}$  con Rhod-2 AM  $3 \mu\text{mol/l}$  (Molecular Probes/Invitrogen) y lavados por 1 h a  $37^\circ\text{C}$  (para medir la señal de  $\text{Ca}^{2+}$  libre mitocondrial) como en trabajos previos (Ragone y col., 2015; Colareda y col., 2016). Las células se colocaron en una cámara precubierta con laminina y se perfundieron superficialmente con solución

Krebs- HEPES con 2 mmol/l  $\text{Ca}^{2+}$  (C) hasta estabilizar, luego de lo cual se inició el respectivo protocolo de perfusión. Las células que permanecieron en la cámara fueron consideradas para los análisis en un microscopio confocal (Leica SP5; Leica Microsystems, Mannheim, Alemania). Los cambios en la fluorescencia fueron registrados y analizados con el software Leica LAS AF Lite version 2.2.1.

Las células cargadas con Fluo-4 fueron excitadas a 488 nm y la fluorescencia de emisión fue detectada a longitudes de onda  $>505$  nm. Las células cargadas con Rhod-2 fueron excitadas a 540 nm, y la fluorescencia de emisión fue detectada a longitudes de onda  $>560$  nm. Siempre, las señales fueron detectadas en un área definida seleccionada (una región de interés por célula) de fluorescencia uniforme (ROI). Los resultados fueron expresados como la intensidad de fluorescencia de emisión normalizada por el valor inicial ( $F/F_0$ ) en las lecturas efectuadas cada 20 s durante los 20 ó 25 minutos del protocolo. Con la señal emitida durante la perfusión de Krebs control (C) al inicio y final del protocolo se ajustó la línea de base en función del tiempo, y se calcularon luego los cambios de dicha señal producidos por la intervención (Krebs-10 mM cafeína y 36 mM Na para liberar el  $\text{Ca}^{2+}$  del RS) sobre esa línea de base ( $\Delta F/F_0$ ). Se usó el software Origin 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

### **Protocolos en cardiomiocitos**

Los cardiomiocitos de rata cargados con Rhod-2 fueron perfundidos con la siguiente secuencia de soluciones con 2 a 5 células visualizadas por

campo de cada corazón en cada protocolo: C (5 min), C + 10 mmol/l cafeína + 36 mmol/l Na<sup>+</sup> (10 min), C (5 min). Este protocolo fue llevado a cabo en corazones de rata macho (CRM) tratados con 1g/kg/día maca administrada vía oral por una semana. Los cardiomiocitos cargados con Fluo-4 se expusieron a los mismos protocolos.

## **Soluciones y drogas**

### *Soluciones para corazones aislados*

La composición de la solución control Krebs (Krebs-C) de perfusión de los ventrículos fue la siguiente (en mmol/l): 1 MgCl<sub>2</sub>, 125 NaCl, 0.5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 KCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub> y 6 glucosa, burbujeada con 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>. Las soluciones fueron similares a aquellas usadas en trabajos previos (Colareda y col., 2018; Ragone y col., 2009).

### *Soluciones para cardiomiocitos*

Para el aislamiento de cardiomiocitos, la composición del Krebs-HEPES fue la siguiente (en mmol/l): 126 NaCl, 4.4 KCl, 1.0 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 MgCl<sub>2</sub>, 24 HEPES, 22 glucosa, 20 taurina, 5 creatina, 0.5 piruvato de sodio, ajustado a pH 7.4 con NaOH. La composición de la solución de perfusión superficial de cardiomiocitos durante el protocolo, Krebs-HEPES (C), fue la siguiente (en mmol/l): 126 NaCl, 4.4 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 24 HEPES, 2 CaCl<sub>2</sub> y 11 glucosa, ajustado a pH 7.4 con NaOH. Para los experimentos con Fluo-4 fue agregado probenecid 0.5 mmol/l.

## *Drogas*

L-NAME (Sigma-Aldrich, Argentina) fue preparado como una solución 100 mmol/l en DMSO. El 5-hidrodecanoato de sodio (5-HD; ICN Biochemicals and Reagents, Santa Ana, CA, USA) fue preparado en una solución 100 mmol/l en DMSO. El clonazepam (Clzp, Droguería Saporiti, Argentina) fue preparado como una solución 0.1 mmol/l en DMSO. La celeritrina (Che, Sigma-Aldrich, USA) fue preparada como una solución 1 mmol/l en DMSO. Todas las drogas fueron diluidas desde sus soluciones almacenadas en Krebs-C al momento del experimento. La cafeína (ICN, Costa Mesa, CA, USA) fue directamente disuelta en solución Krebs el día del experimento.



## **Protocolos para el estudio del efecto y el mecanismo de acción de maca en la isquemia y reperfusión**

### **Protocolos base del modelo de atontamiento severo por I/R**

Una vez estabilizados los desarrollos de P y Ht del corazón perfundido con Krebs control (C) se efectuó un período de registro de 15 minutos, seguido por el corte de perfusión para desarrollar un período de isquemia de no-flujo de 30 minutos. Al finalizar este lapso, se reperfundió el corazón con Krebs control (C) durante 45 minutos.

Ese protocolo se efectuó en corazones de rata hembra, rata macho y ratas hembras seniles.

### **Efectos de la harina de raíz de maca**

En los 3 grupos de ratas (hembras, machos y hembras seniles) se efectuó un tratamiento oral con la administración de una suspensión de la harina de maca en agua, en dosis de 1 g/kg diariamente durante 7 días. Pasado un día de finalizado el tratamiento, se aislaron los corazones para realizar el protocolo base de atontamiento severo.

### **Estudio del mecanismo de cardioprotección**

Luego de corroborar la protección ante la I/R por el tratamiento oral con harina de maca, se realizaron protocolos de perfusión con inhibidores selectivos previo a la I/R en los respectivos grupos de ratas tratados con maca. Siguiendo el protocolo experimental, se perfundieron los ventrículos con solución Krebs-control hasta estabilizar la fuerza de contracción (P) y el

flujo de calor (Ht). Posteriormente, durante un período de 15 minutos, previo a la I/R se perfundieron los ventrículos con las siguientes herramientas farmacológicas, seleccionadas según la secuencia de hipótesis que surgieron de los resultados previos en el laboratorio:

Celeritrina (Che, 1  $\mu\text{M}$ ): para bloquear las proteína-quinasa C se perfundió 1  $\mu\text{M}$  de celeritrina en la solución Krebs.

5-hidrodecanoato (5-HD, 100  $\mu\text{M}$ ): para lograr inhibición directa del canal de  $\text{K}^+$  mitocondrial (mKATP).

L-NAME (100  $\mu\text{M}$ ): para inhibir a las NO sintasas, y así reducir la producción de NO.

Combinación L-NAME + 5-HD: Suponiendo una protección mixta por la vía del NO y del mKATP, se perfundieron ambas drogas conjuntamente, 100  $\mu\text{M}$  L-NAME y 100  $\mu\text{M}$  5-HD.

Clonazepam (Clzp 10  $\mu\text{M}$ ): para inhibir el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (mNCX).

En la Figura 11 se muestra el esquema de protocolos desarrollados en esta Tesis.

Figura 11: Protocolos experimentales sobre ventrículo aislado de rata en hembras jóvenes (CRH), en hembras seniles (CRS), y en machos jóvenes (CRM), control y tratadas con MACA. Intervenciones con Clonazepam (Clzp), L-NAME, Celeritrina (Che) y 5-HD.

	Control	Isquemia	Reperusión	CRH	
	Control	Isquemia	Reperusión	CRM	
	Control	Isquemia	Reperusión	CRS	
MACA 1g/kg/día Oral 1 semana	Control	Isquemia	Reperusión	MACA CRH	
	Control	Isquemia	Reperusión	MACA CRM	
	Control	Isquemia	Reperusión	MACA CRS	
	C	Che 1 $\mu$ M	Isquemia	Reperusión	MACA + Che CRM
	C	5-HD 100 $\mu$ M	Isquemia	Reperusión	MACA + 5HD CRM
	C	L-NAME 100 $\mu$ M	Isquemia	Reperusión	MACA + L-NAME CRH
	C	L-NAME +5HD	Isquemia	Reperusión	MACA + L-NAME + 5HD CRH
	C	Clzp 10 $\mu$ M	Isquemia	Reperusión	MACA + Clzp CRH
t (min)	0	5	20	50	95

## **Análisis estadístico**

Los protocolos con animales han evolucionado en la dirección de reducir al mínimo los experimentos necesarios, según sugiere el CICUAL. En los experimentos se aplicó la regla de reducir al mínimo número de experimentos necesarios para obtener la definición estadística (la potencia aceptada para rechazar la hipótesis nula a  $\alpha = 0.05\%$  en cada grupo) con un  $n = 4$  a  $6$  (Dupont y Plummer, 1990). Los grupos no fueron aleatorizados debido a que no fueron realizados de manera simultánea, sino en secuencia para obtener los resultados de cada condición. Sin embargo, las ratas son homogéneas en origen, peso y mantenimiento.

Todos los resultados fueron expresados como promedio  $\pm$  SEM ( $n$ ) y se consideraron normalmente distribuidos. Se realizaron comparaciones múltiples de los tratamientos versus tiempo con un ANOVA de dos vías, evaluando la hipótesis de que existe al menos una diferencia entre los tratamientos de cada variable (tratamiento y tiempo). Se realizaron las correspondientes comparaciones múltiples como *tests post-hoc* entre los tratamientos (Sidak a cada tiempo para comparar dos condiciones, y Tukey a cada tiempo para más de dos tratamientos). Siempre se consideró un nivel de significancia de  $P < 0.05$ .

Todos los análisis estadísticos fueron desarrollados usando el programa GraphPad Prism v.6.0.

## **Resultados**

## **Rótulo**

El producto adquirido “Maca 100% pura marca Kallpa” es producido por la empresa Agroindustrias Chaska S.R.L. RUC: 20452267510. Legalmente inició sus actividades el 15 de septiembre de 2001 y fue dada de baja de oficio (dato obtenido de la base de datos de universidadperu.com). Posee un teléfono de contacto y una dirección de internet que no se corresponde a la empresa.

El producto manifiesta ser “Regulador hormonal y revitalizante de células” y “Prolongador de la vida, fertilidad y vigor sexual”, además del “Desarrollo armónico de niños y jóvenes”, que “calcifica los huesos” y que “combate la desnutrición”.

La indicación que menciona el rótulo es el “Agotamiento físico, mental y stress, y regula el sistema nervioso”.

Aconseja consumirlo con leche, yogurt o en sopas o guisos, a las dosis de ½ cucharada en niños 2 veces por día, ó 1 cucharada por día en jóvenes, adultos, deportistas y estudiantes.

El rótulo del producto (Figura 12) no posee información sobre la importación en Argentina, manifiesta ser maca orgánica 100% pura de origen peruano. La fecha de vencimiento es actual, el producto adquirido vence en diciembre del 2020.

La falta de información sobre el producto fue notada por la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), que en su Disposición 5323/2016, prohibió la comercialización de “Maca”, marca Kallpa, elaborado por Agroindustrias Chaska S.R.L., de la

localidad de Ayacucho, Perú. Las razones expresadas por la autoridad sanitaria son que el producto se halla en infracción al artículo 3° de la Ley 18284, al artículo 3° del Anexo II del Decreto 2126/71 y a los artículos 13, 155 y 8 del CAA por carecer de autorización de producto y de establecimiento, resultando ser un producto ilegal y por contener un ingrediente que no está expresamente admitido por dicho ordenamiento legal.

Figura 12: Rótulo de la harina de maca marca Kallpa



## **Resultados del análisis de materia prima**

La maca fue observada con el microscopio óptico en cuanto a las características micrográficas generales y en especial se analizaron los almidones para corroborar la presencia de maca, *Lepidium meyenii* Walp, para descartar sustitutos o adulterantes.

El análisis micrográfico se realizó bajo las sugerencias de Bassols y col. (2010), quienes realizaron la micrografía de maca para diagnosticar la presencia de esta especie en diferentes productos. Describe los granos de almidón simples, polimórficos, algunos de forma irregular ovoide o esférico cuyo hilio tiene una posición excéntrica y sin estrías, de tamaño entre 12,5 a 17,5  $\mu\text{m}$ , fácilmente diferenciable de los almidones de maíz, papa y quinua, que se emplean para la fabricación de otras harinas (Prego y col., 1998; Agama-Acevedo y col., 2005).

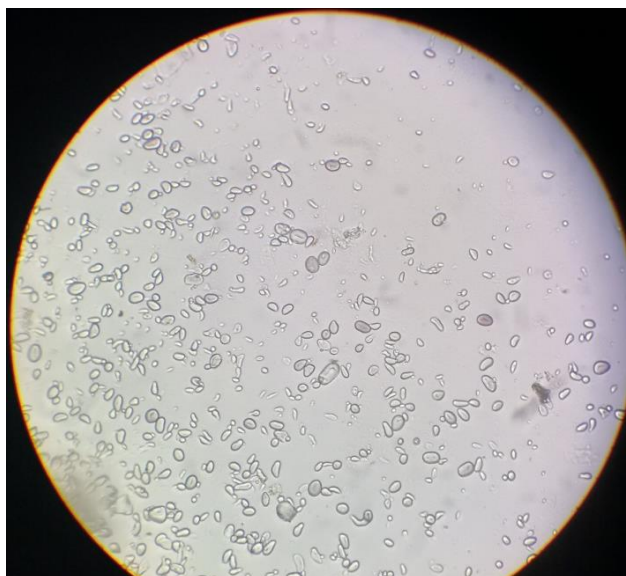
Se realizó un extendido del hipocótilo de maca, traído de Perú, encontrando almidones pequeños irregulares con hilio alargado fisurado (Figura 13). Aparte se hirvió un pequeño trozo de maca y posteriormente se tiñó con Lugol, los amiloplastos se observaron dentro de la célula de reserva (Figura 14).

El extendido de la harina de Maca (Kallpa) mostró almidones con el hilio alargado fisurado, pero debido al procesamiento, se observan un poco hinchados y deformados (Figura 15). Además se descartó la presencia de harina de soja, ya que se comparó con un extendido del poroto de soja (Figura 16), donde se observa que los amiloplastos son bien esféricos y pequeños. Por otro lado, el análisis de la Maca Kallpa fue también realizado



por Inés Cristina (2015) en su tesis de doctorado, sin encontrar la presencia de otras especies, y publicó la imagen obtenida de este producto en microscopio electrónico y de otras marcas en microscopio óptico (Figura 17).

*Figura 13: Extendido de almidones del hipocótilo de Maca de referencia (400x).*



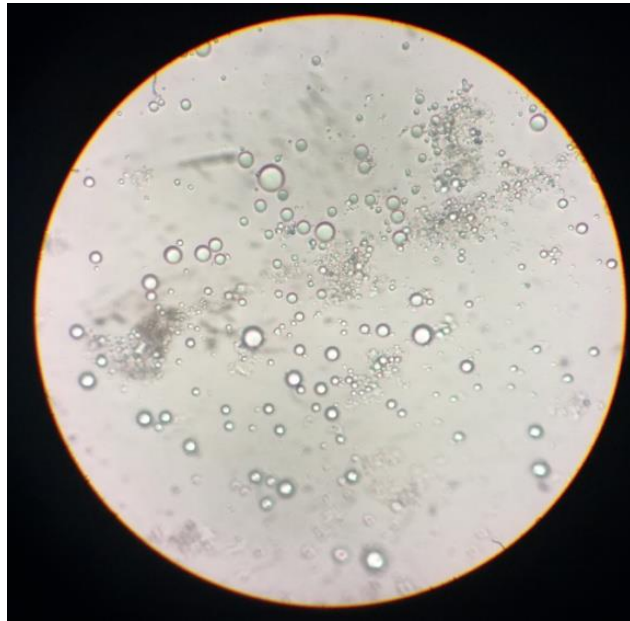
*Figura 14: Amiloplastos dentro de la célula de reserva del hipocótilo (400x).*



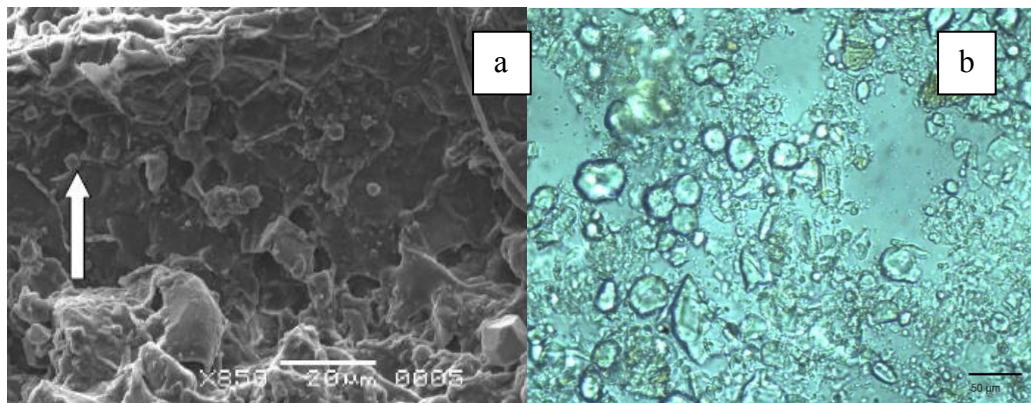
Figura 15: Extendido de harina de Maca marca Kallpa. Vista al microscopio óptico (400x) de almidones de maca (arriba). Detalle de amiloplasto con hilio alargado (abajo).



*Figura 16: Extendido de poroto de soja (400x). Se observa que los almidones son esféricos, a diferencia de los de Maca.*



*Figura 17: Maca marca Kallpa bajo microscopio electrónico (a) y Maca marca Incamac (b) en microscopio óptico. Adaptada de Inés Cristina, 2015 para comparar con los resultados de esta Tesis.*



## **Evaluación de los efectos de maca por administración oral**

### **Efectos de la harina de maca por administración oral en la I/R de corazones de ratas macho jóvenes**

La cardioprotección de maca se demostró en los corazones aislados de rata macho jóvenes tratadas con una suspensión de maca oral 1g/kg/día durante una semana. Los resultados fueron comparados con un grupo control y se muestran en la Figura 18. Los valores absolutos iniciales de P, Ht y P/Ht de todos los grupos de tratamiento se muestran en la Tabla 1.

La maca protegió del daño producido por I/R ya que: A) aumentó la recuperación de la fuerza de contracción medida como la máxima presión desarrollada (P, como % del valor inicial preisquémico) hasta un  $44.6 \pm 8.1$  % (n = 5) vs.  $14.5 \pm 2.4$  % (n = 6) del grupo control a los 45 minutos de R; B) no modificó la recuperación energética medida como flujo de calor total (Ht, como % del inicial); y C) mejoró significativamente la economía muscular (P/Ht, como % del valor inicial) tempranamente en la reperfusión aunque cayó hacia el final de ésta; y D) mantuvo la contractura ventricular izquierda durante la diástole ( $\Delta$ LVEDP) similar al grupo control, excepto un aumento sólo a los 5 minutos de reperfusión ( $+51.1 \pm 14.7$  mmHg vs.  $+17.9 \pm 2.6$  mmHg), sin alteraciones posteriores (Figura 18).

Además, en la Figura 19 se muestra que la maca aumentó las máximas velocidades de contracción y relajación (dP/dt) normalizadas por P (+P/P, -P/P) y acortó los tiempos de contracción totales (TT), en los corazones de ratas macho respecto al grupo control (no tratado) en los primeros 10 minutos de la reperfusión.

La Tabla 2 muestra los resultados estadísticos de ANOVA de 2 vías de los parámetros mecánico-energéticos (P, Ht, P/Ht,  $\Delta$ LVEDP) durante I/R, incluyendo todos los tratamientos efectuados en ratas macho que se describen en los sucesivos apartados. También muestra el análisis ANOVA de las velocidades relativas (+P/P, -P/P y TT) del grupo de maca vs control.

Cuando se compararon todos los experimentos provenientes de ratas macho tratadas con maca antes del protocolo de I/R, la maca aumentó significativamente las velocidades de contracción y relajación (Tabla 3).

*Tabla 1: Valores absolutos iniciales de P, Ht, y P/Ht en todos los grupos de corazones de ratas evaluados.*

	Tratamiento	P (mmHg)	Ht (mW/g)	P/Ht (mmHg.g/mW)
Machos	Control (n=6)	103 ± 8	19 ± 2	5.6 ± 0.6
	Maca (n=5)	71 ± 15	11 ± 2	6.5 ± 1.2
	Maca + Che (n=5)	70 ± 7	13 ± 1	5.7 ± 0.8
	Maca + 5HD (n=5)	69 ± 12	17 ± 3	4.3 ± 0.7
Hembras	Control (n=6)	66 ± 16	14 ± 3	4.4 ± 0.4
	Maca (n=6)	104 ± 10	20 ± 2	6 ± 1
	Maca+L-NAME (n=2)	89 ± 2	23 ± 1	3.8 ± 0.3
	Maca + L-NAME + 5HD (n=5)	99 ± 11	19 ± 3	5.3 ± 0.4
	Maca + Clzp (n=5)	77 ± 10	20 ± 2	3.9 ± 0.4
Seniles	Control (n=5)	66 ± 7	17 ± 1	3.9 ± 0.3
	Maca (n=4)	35 ± 10	17 ± 5	3 ± 1

Figura 18: Efectos de maca 1 g/kg/día oral durante la I/R en corazones de rata macho jóvenes (CRM). A) Máxima presión desarrollada en la contracción (como % de P inicial). B) Flujo de calor (como % del Ht inicial). C) Economía muscular total (P/Ht en mmHg.g/mW como % del inicial). Y D) cambios en la presión diastólica ( $\Delta$ LVEDP) durante la I (5 y 30 minutos) y la R (5 y 45 min) respecto del valor inicial. Ver estadística ANOVA en tabla 2. (\*  $p < 0.05$  vs control)

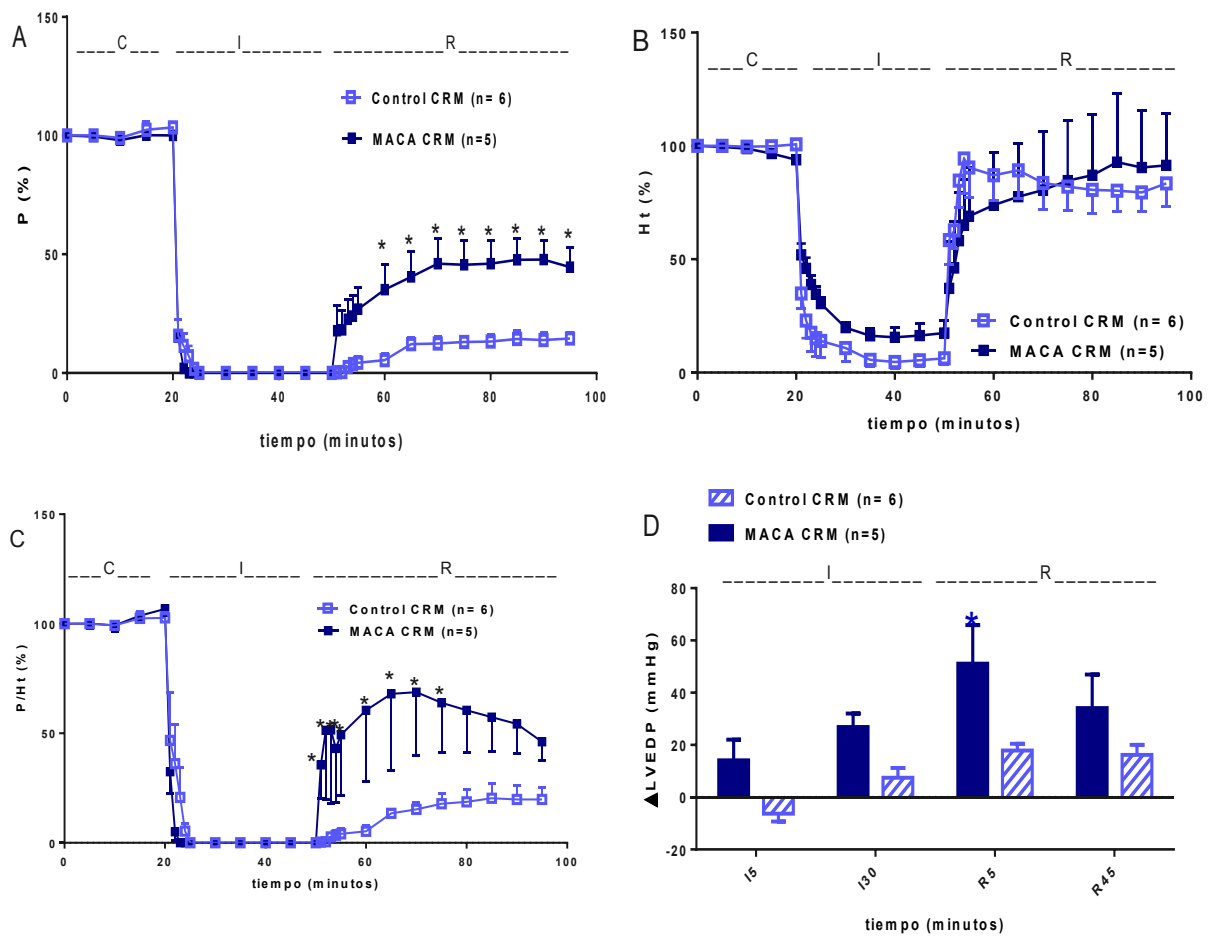


Figura 19: Efectos de maca 1 g/kg/día oral durante la I/R en corazones de rata macho adultos jóvenes (CRM) sobre A) velocidad de contracción normalizada (+P/P), B) velocidad de relajación normalizada (-P/P). C) Tiempos totales de la contracción (TT). Ver estadística en tabla 2. \*  $p < 0.05$  vs control.

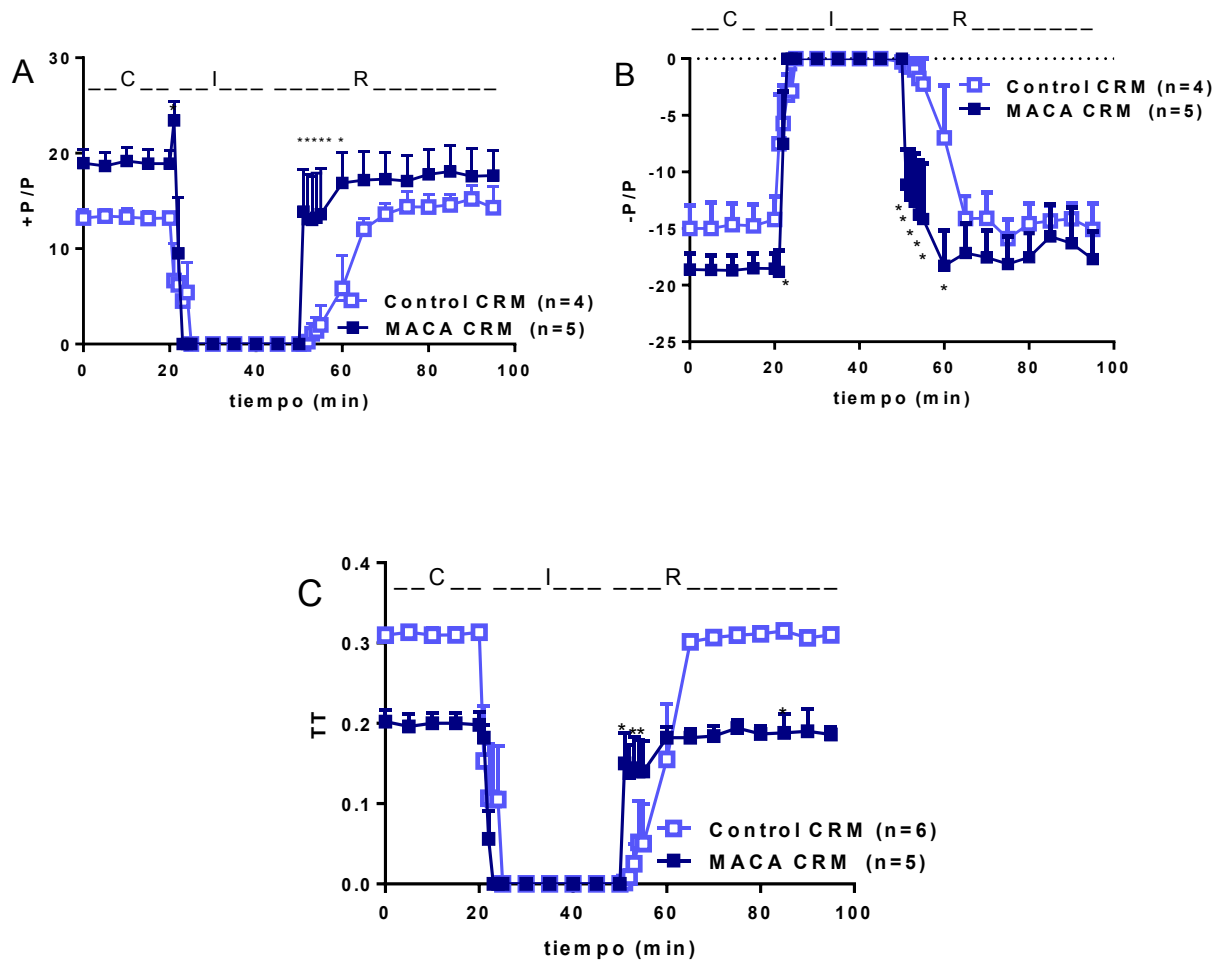


Tabla 2: Resultados del análisis de ANOVA de 2 vías efectuados para los tratamientos aplicados en los corazones de rata macho durante I/R. Las respectivas figuras muestran las comparaciones a posteriori con \*  $p < 0.05$ .

Variables 2-way ANOVA	Machos						
	P (%)	Ht (%)	P /Ht (%)	$\Delta$ LVEDP (mm Hg)	+P/P	-P/P	TT
Tratamiento	F = 15.75 DF = 3 P < 0.0001	F = 0.5809 DF = 3 P = 0.6278	F = 17.27 DF = 3 P < 0.0001	F = 7.494 DF = 3 P = 0.0002	F = 6.513 DF = 1 P = 0.0380	F = 7.527 DF = 1 P = 0.0288	F = 8.176 DF = 1 P = 0.0188
Tiempo	F = 78.83 DF = 27 P < 0.0001	F = 31.90 DF = 27 P < 0.0001	F = 32.74 DF = 27 P < 0.0001	F = 12.66 DF = 3 P < 0.0001	F = 21.18 DF = 27 P < 0.0001	F = 21.02 DF = 27 P < 0.0001	F = 30.22 DF = 27 P < 0.0001
Interacción	F = 2.313 DF = 81 P < 0.0001	F = 0.5762 DF = 81 P = 0.9986	F = 1.654 DF = 81 P = 0.0007	F = 1.271 DF = 9 P = 0.2689	F = 3.933 DF = 27 P < 0.0001	F = 2.889 DF = 27 P < 0.0001	F = 5.831 DF = 27 P < 0.0001
DF residual	476	476	476	68	189	189	243

Tabla 3: Efectos de maca 1 g/kg/día oral en las velocidades relativas de contracción y de relajación y tiempo total de contracción en corazones de rata macho jóvenes (CRM) antes de aplicar la I/R.

Variables t-test	CRM		
	+P/P	-P/P	TT
Maca (n=14)	21.06 ± 0.97	-16.95 ± 0.71	0.20 ± 0.01
Control (n=4)	13.22 ± 0.86	-14.99 ± 2.06	0.31 ± 0.01
t-test			
P	0.0008	0.2626, NS	<0.0001
t	4.134	1.161	7.784
df	16	16	16



## **Efectos de la harina de maca por administración oral en la I/R de corazones de ratas hembra jóvenes**

Los resultados de la administración oral de maca 1g/kg/día en rata hembra comparada con su respectivo grupo control no tratado se muestran en la Figura 20. Los valores absolutos iniciales de P, Ht y P/Ht se mostraron en la Tabla 1.

Se encontró que la maca protegió también a las hembras de la disfunción producida por I/R, puesto que recuperó A) la fuerza de contracción (medida como máxima presión desarrollada y expresada como % de la P inicial) hasta un  $+47.61 \pm 7.96$  % (n=6) vs.  $+23.01 \pm 6.20$  % (n=6) del grupo control a los 45 min R; B) sin modificar la recuperación energética (Ht, como % del inicial); C) con mejoría de la economía muscular (P/Ht) significativamente en la reperfusión hasta un  $+67.6 \pm 9.9$  % (n=6) vs.  $+37.9 \pm 11.2$  % (n=6). D) Sin embargo, generó una contractura ventricular diastólica ( $\Delta$ LVEDP) mayor al control al final de la reperfusión  $+73.3 \pm 20.5$  mmHg vs.  $+31.4 \pm 3.2$  mmHg (Figura 20). Además, se muestra en la Figura 21 que la harina de maca no modificó las velocidades relativas de contracción y relajación (+P/P, -P/P) y tiempos totales de la contracción (TT) durante R, respecto al grupo control, a diferencia del efecto en ratas macho.

La Tabla 4 muestra los resultados estadísticos de ANOVA de 2 vías de los parámetros mecánico-energéticos (P, Ht, P/Ht,  $\Delta$ LVEDP) durante I/R, en todos los tratamientos efectuados en ratas hembra jóvenes que se describen en los sucesivos apartados. También muestra el análisis ANOVA de las velocidades relativas (+P/P, -P/P y TT) del grupo de maca vs control.

Si se comparan todos los experimentos provenientes de ratas hembra tratadas con maca, puede verse que antes del protocolo de I/R la maca no aumentó significativamente las velocidades relativas de contracción, e incluso redujo la de relajación (Tabla 5).

Figura 20: Efectos de maca 1 g/kg/día oral durante la I/R en corazones de rata hembra jóvenes (CRH). A) Máxima presión desarrollada en la contracción (como % de P inicial). B) Flujo de calor (como % del Ht inicial), C) Economía muscular total (P/Ht en mmHg.g/mW, en % del inicial), D) Cambios en la presión diastólica ( $\Delta$ LVEDP) durante la I (5 y 30 minutos) y la R (5 y 45 min) respecto del valor inicial. Ver estadística en tabla 4. (\* $p < 0.05$  vs control)

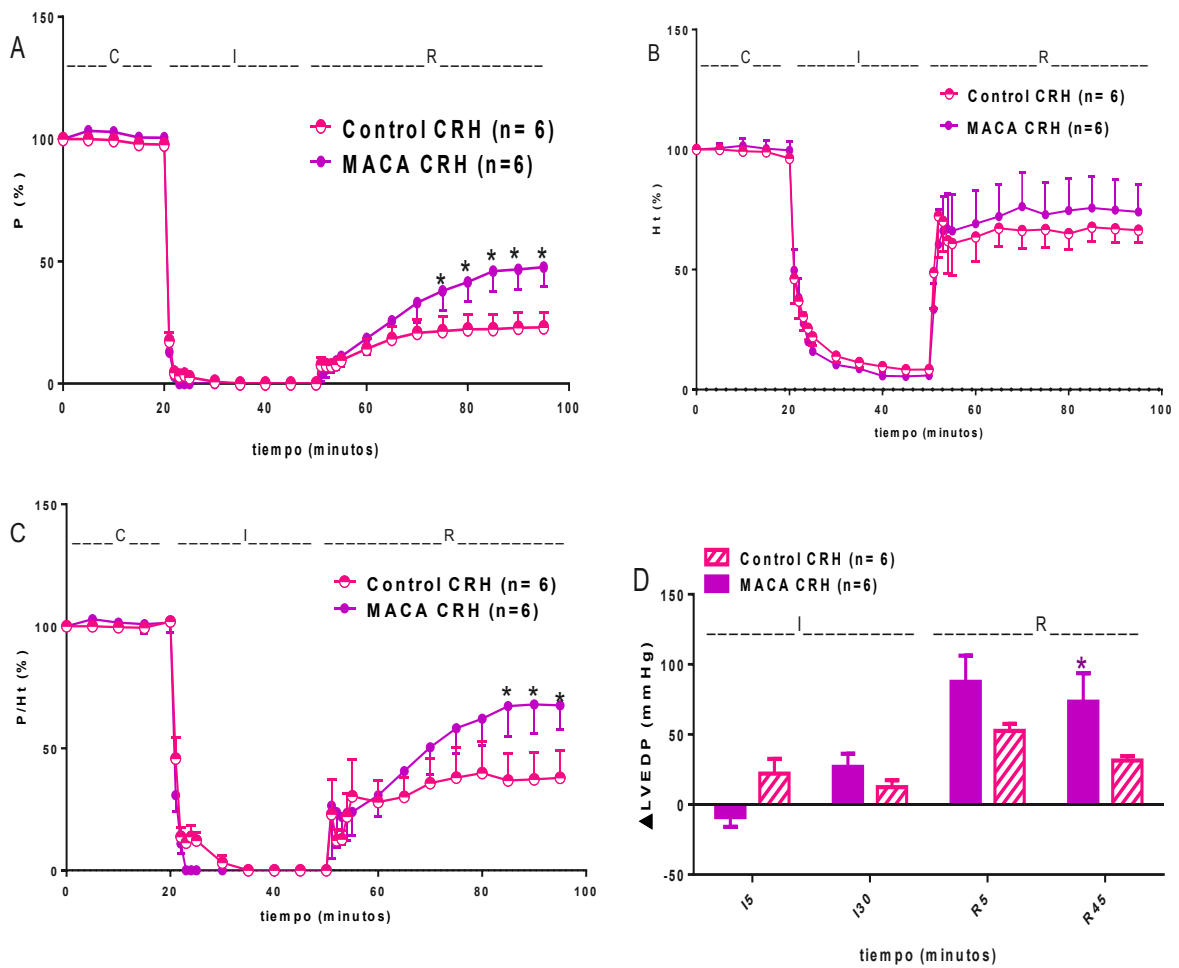


Figura 21: Efectos de maca 1 g/kg/día oral durante la I/R en corazones de rata hembra jóvenes (CRH) sobre A) velocidad de contracción normalizada (+P/P), B) velocidad de relajación normalizada (-P/P). C) Tiempos totales de la contracción (TT). Ver estadística en tabla 4.

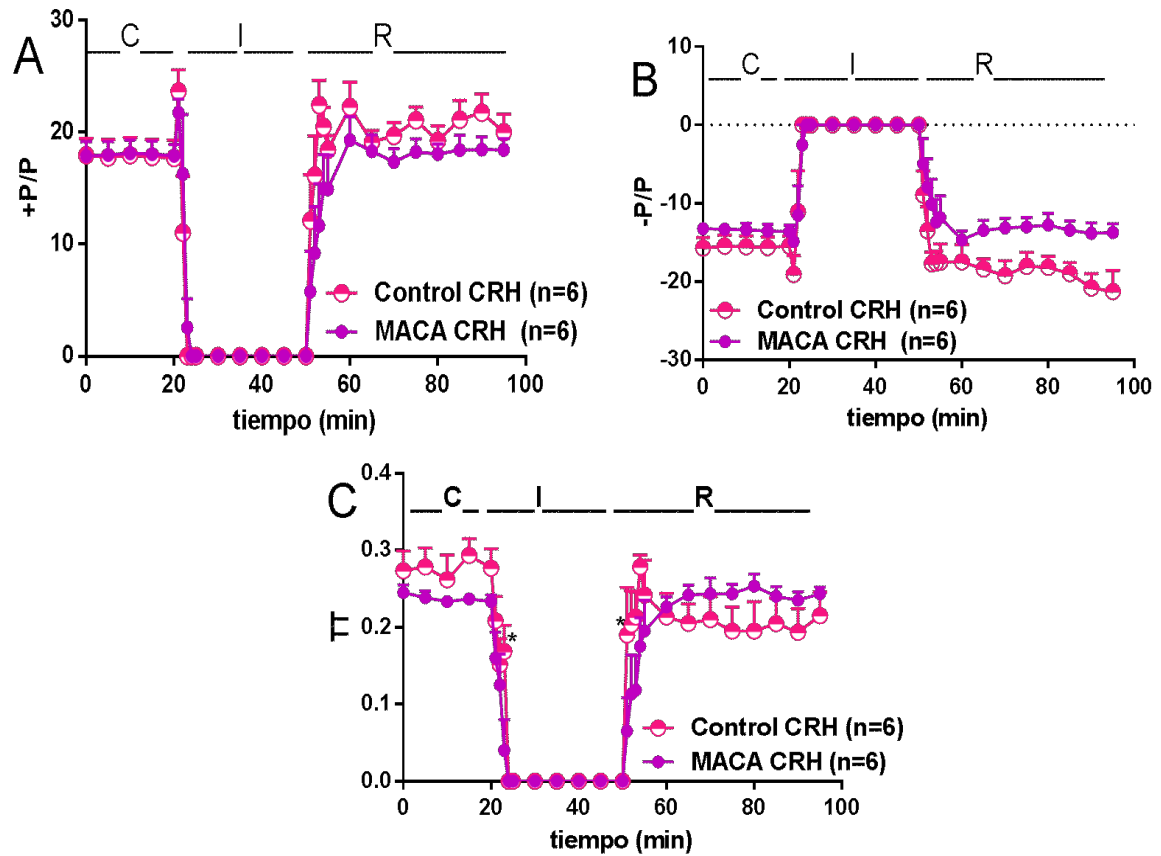


Tabla 4: Estadística de los tratamientos realizados en corazones de ratas hembra jóvenes (CRH) durante I/R. Las respectivas figuras muestran las comparaciones a posteriori con \*  $p < 0.05$ .

Variables 2-way ANOVA	Hembras						
	P (%)	Ht (%)	P /Ht (%)	$\Delta$ LVEDP (mm Hg)	+P/P	-P/P	TT
Tratamiento	F = 15.73 DF = 3 P < 0.0001	F = 20.35 DF = 3 P < 0.0001	F = 15.71 DF = 3 P < 0.0001	F = 3.254 DF = 3 P = 0.0266	F = 9.606 DF = 1 P = 0.0113	F = 8.066 DF = 1 P = 0.0175	F = 2.299 DF = 1 P = 0.1604
Tiempo	F = 222.4 DF = 27 P < 0.0001	F = 44.75 DF = 27 P < 0.0001	F = 71.61 DF = 27 P < 0.0001	F = 20.76 DF = 3 P < 0.0001	F = 32.09 DF = 27 P < 0.0001	F = 36.83 DF = 27 P < 0.0001	F = 29.02 DF = 27 P < 0.0001
Interacción	F = 1.649 DF = 81 P = 0.0008	F = 0.7813 DF = 81 P = 0.9150	F = 0.0843 DF = 81 P = 0.0843	F = 1.278 DF = 9 P = 0.2639	F = 2.536 DF = 27 P < 0.0001	F = 1.340 DF = 27 P = 0.1265	F = 3.142 DF = 27 P < 0.0001
DF residual	504	504	504	72	270	270	270

Tabla 5: Efectos de maca 1 g/kg/día oral en las velocidades relativas de contracción y de relajación y tiempo total de contracción en corazones de rata hembra jóvenes (CRH) antes de aplicar la I/R.

Variables t-test	CRH		
	+P/P	-P/P	TT
Maca (n=18)	18.5 ± 0.8	-13.3 ± 0.3	0.24 ± 0.01
Control (n=6)	18 ± 2	-16 ± 1	0.27 ± 0.03
t-test			
P	0.7190, NS	0.0164	0.0520
t	0.3645	2.600	2.055
df	22	22	22

## **Evaluación de los efectos de maca por administración oral en la I/R de corazones de ratas hembra seniles**

Luego de la administración de la suspensión de maca vía oral en ratas hembra seniles no se comprobó un efecto cardioprotector mayor al respectivo control de ratas seniles no tratadas. En la Figura 22 se muestran los resultados obtenidos. Los valores absolutos iniciales de P, Ht y P/Ht se mostraron en la Tabla 1.

La maca no protegió del daño producido por I/R ya que: A) no hubo aumento en la recuperación de la fuerza de contracción (P%); B) no se modificó la recuperación del flujo de calor (Ht%), C) tampoco mejoró significativamente la economía muscular (P/Ht), pero D) potenció la contractura diastólica ( $\Delta$ LVEDP) del ciclo I/R respecto al control a los 5 minutos y al final de la reperfusión ( $+32.6 \pm 13.7$  mmHg vs.  $+80.3 \pm 6.7$  mmHg y  $+19.4 \pm 11.1$  mmHg vs.  $+74.9 \pm 9.1$  mmHg, respectivamente) (Figura 22). Además, la Figura 23 muestra que la maca no modificó significativamente las velocidades relativas de contracción o de relajación (+P/P, -P/P) ni los tiempos totales de la contracción (TT).

La Tabla 6 muestra los resultados estadísticos de ANOVA de 2 vías de los parámetros P, Ht, P/Ht,  $\Delta$ LVEDP, +P/P, -P/P y TT en los corazones de ratas hembra seniles tratadas con maca y sin tratar, durante la I/R. Las diferencias significativas de comparaciones *a posteriori* se muestran en las figuras.

Figura 22: Efectos de maca 1 g/kg/día oral durante la I/R en corazones de rata hembra seniles (CRS). A) Máxima presión desarrollada en la contracción (como % de P inicial). B) Flujo de calor (como % del Ht inicial), C) Economía muscular total (P/Ht en mmHg.g/mW, en % del inicial), D) Cambios en la presión diastólica ( $\Delta$ LVEDP) durante la I (5 y 30 minutos) y la R (5 y 45 min) respecto del valor inicial. Ver estadística en tabla 6. \*  $p < 0.05$  vs control.

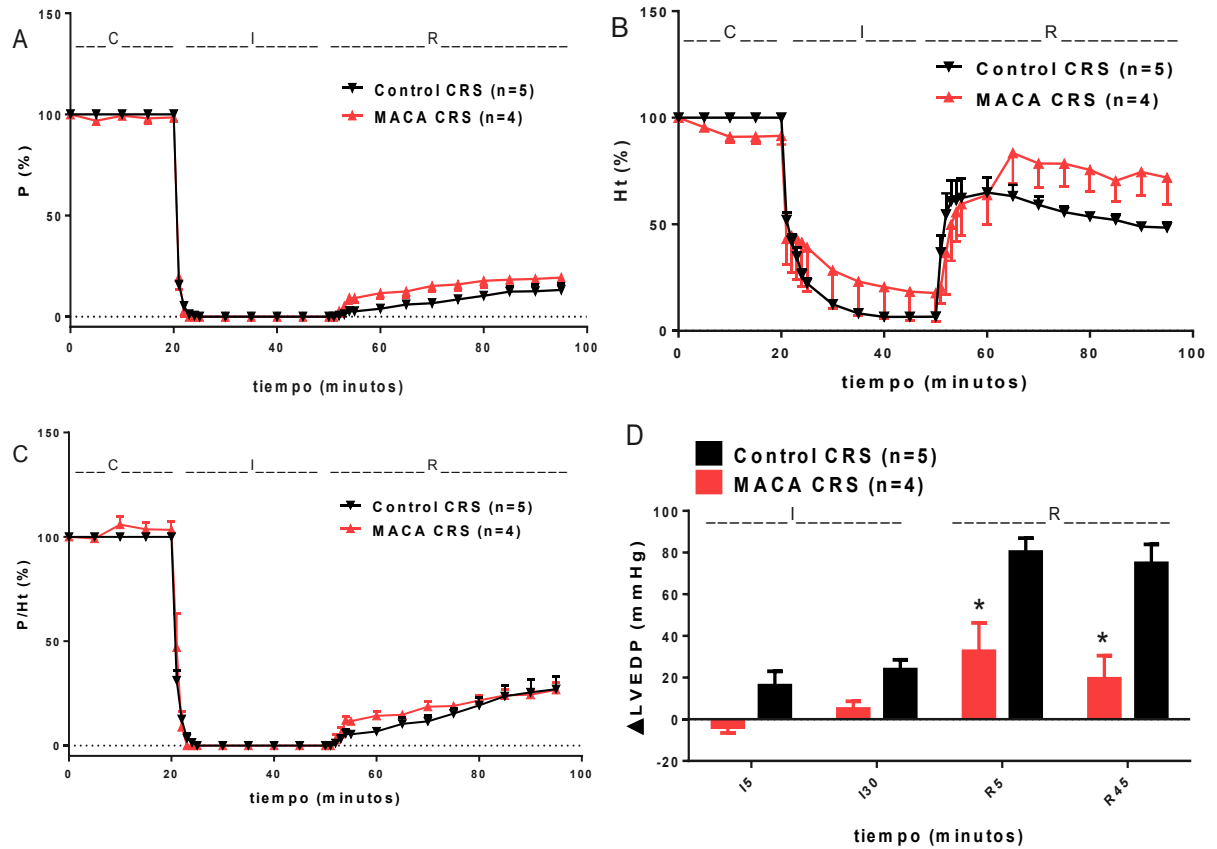


Figura 23: Efecto en la A) velocidad de contracción (+P/P) y B) relajación (-P/P) y C) tiempos totales de contracción (TT), en corazones de rata hembra seniles tratadas con maca vs su respectivo control. Ver estadística en tabla 6.

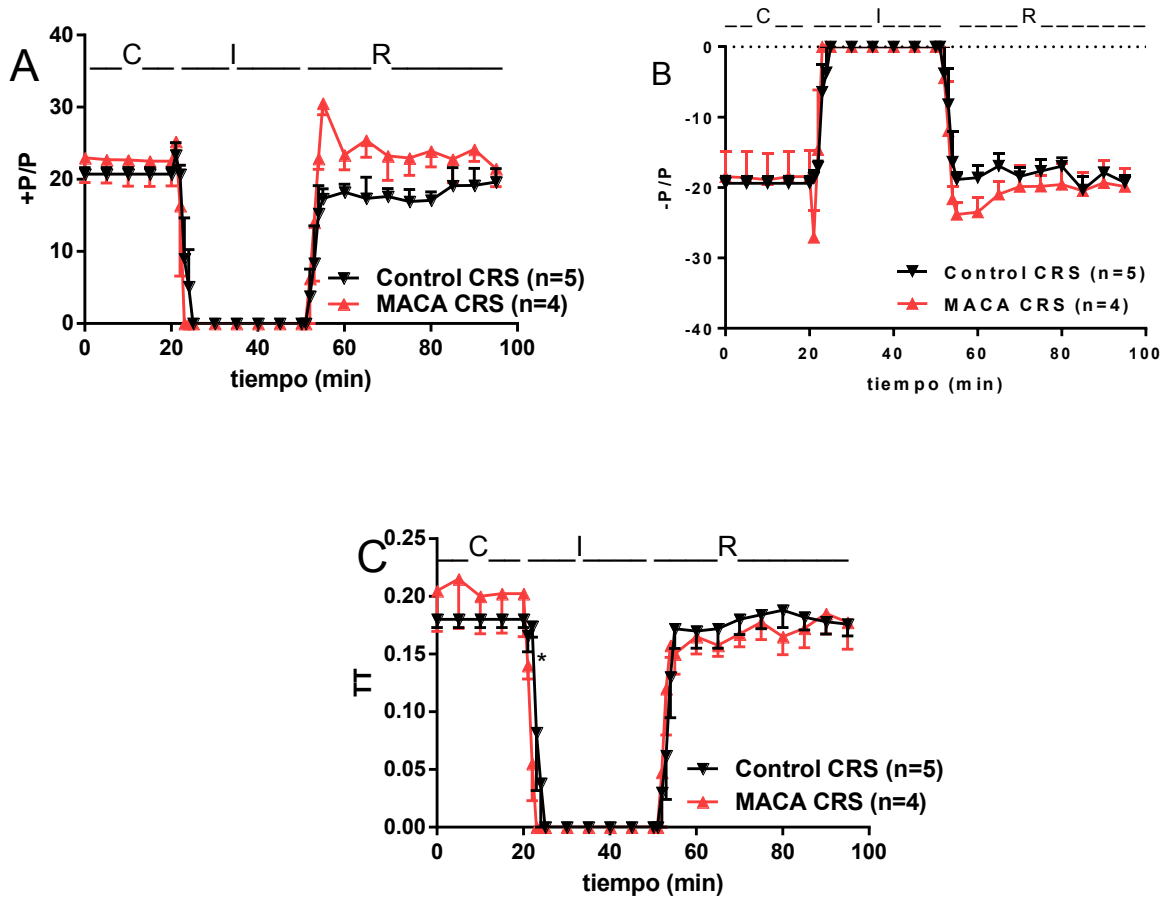


Tabla 6: Estadística de los resultados de los corazones de ratas hembra seniles en grupos control y tratado con maca.

Variables 2-way ANOVA	Hembras Seniles						
	P (%)	Ht (%)	P /Ht (%)	$\Delta$ LVEDP (mm Hg)	+P/P	-P/P	TT
Tratamiento	F = 2.938 DF = 1 P = 0.1302	F = 0.8783 DF = 1 P = 0.3799	F = 1.415 DF = 1 P = 0.2731	F = 20.22 DF = 1 P = 0.0028	F = 1.254 DF = 1 P = 0.2997	F = 0.2067 DF = 1 P = 0.6631	F = 0.1763 DF = 1 P = 0.0489
Tiempo	F = 1353 DF = 27 P < 0.0001	F = 22.55 DF = 27 P < 0.0001	F = 306.4 DF = 27 P < 0.0001	F = 27.77 DF = 3 P < 0.0001	F = 30.92 DF = 27 P < 0.0001	F = 33.25 DF = 27 P < 0.0001	F = 34.47 DF = 27 P < 0.0001
Interacción	F = 3.481 DF = 27 P < 0.0001	F = 0.1129 DF = 27 P = 0.1129	F = 0.9243 DF = 27 P = 0.5769	F = 4.117 DF = 3 P = 0.0192	F = 1.550 DF = 27 P = 0.0488	F = 0.8998 DF = 27 P = 0.6118	F = 1.549 DF = 27 P = 0.0489
DF residual	189	189	189	21	189	189	189

## **Evaluación del mecanismo de acción de la maca en la isquemia y reperfusión**

Considerando el mecanismo de acción de la genisteína que está presente en la maca, se hipotetizó que la administración oral subaguda de harina de maca podría activar las mismas vías cardioprotectoras.

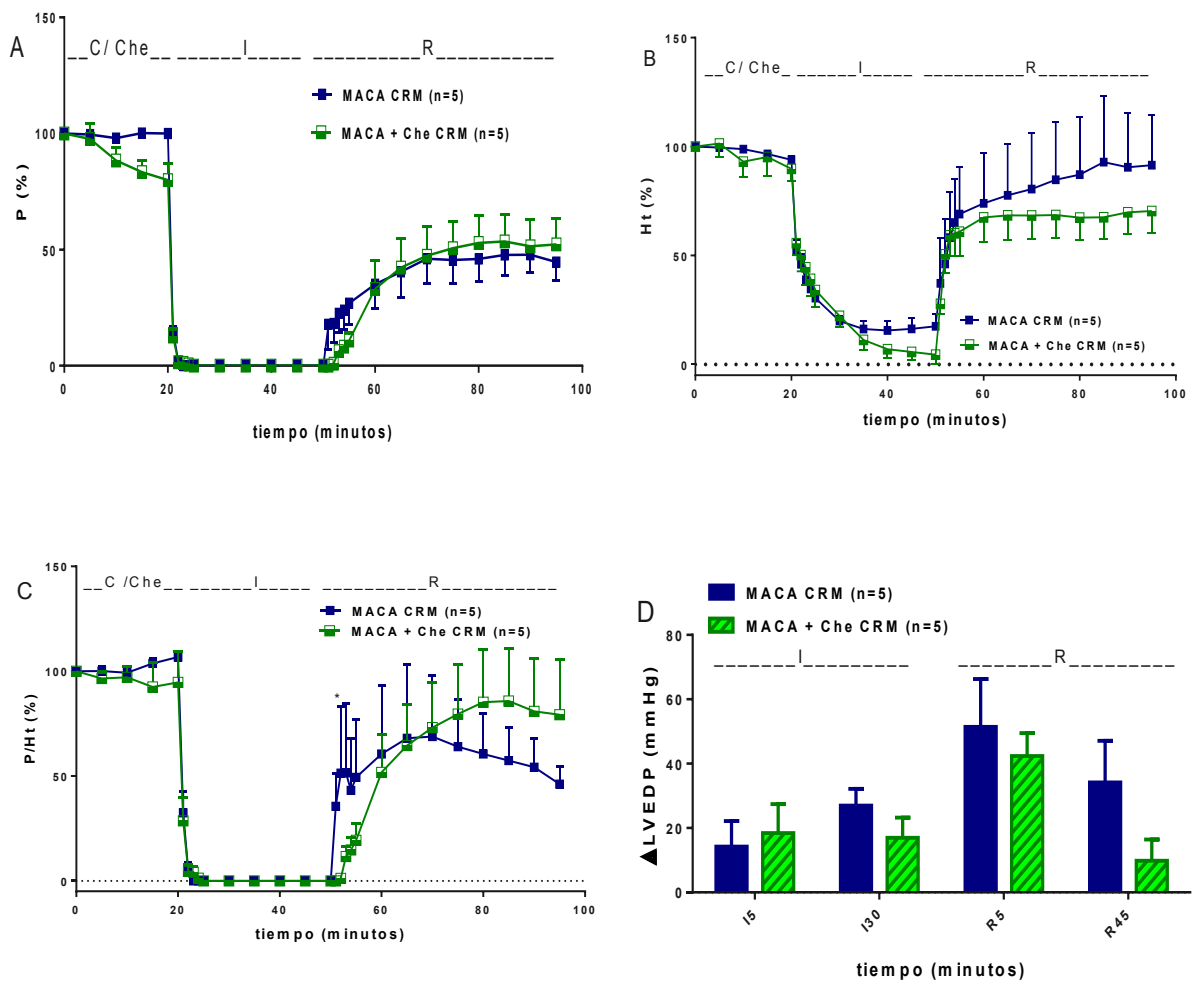
### **Rol de la PKC en los efectos de la maca**

Para evaluar si está implicada la vía de la PKC en la cardioprotección de maca en I/R, se realizó la perfusión de celeritrina 1  $\mu\text{M}$  15 minutos antes de la isquemia en los corazones de ratas macho tratadas con maca. Celeritrina es un inhibidor (isoenzima no-selectivo) de las proteína-quinasa C (PKC). La Figura 24 muestra los resultados de la administración oral de maca 1g/kg/día en ratas macho jóvenes comparados con el grupo tratado con maca y perfundido con celeritrina 1  $\mu\text{mol/l}$ . Los valores absolutos iniciales de P, Ht y P/Ht se mostraron en la Tabla 1.

La celeritrina no inhibió la mejoría en la recuperación mecánico-energética inducida por maca durante la R, ya que mantuvo la recuperación contráctil (P), del flujo de calor (Ht), de la economía muscular (P/Ht) y de la contractura típica de la I/R ( $\Delta\text{LVEDP}$ ) (Figura 24).



Figura 24: Efectos de perfundir 1  $\mu\text{mol/l}$  celeritrina (Che) antes de la I/R en corazones de ratas macho jóvenes (CRM) tratadas con maca 1 g/kg/día oral durante una semana. A) Máxima presión desarrollada en la contracción (P como % del inicial). B) Flujo de calor (como Ht en % del inicio). C) Economía muscular total (P/Ht en mmHg.g/mW como % del inicial). Y D) cambios en la presión diastólica durante la I (5 y 30 minutos) y la R (5 y 45 min) respecto del valor inicial. Ver estadística en tabla 2.

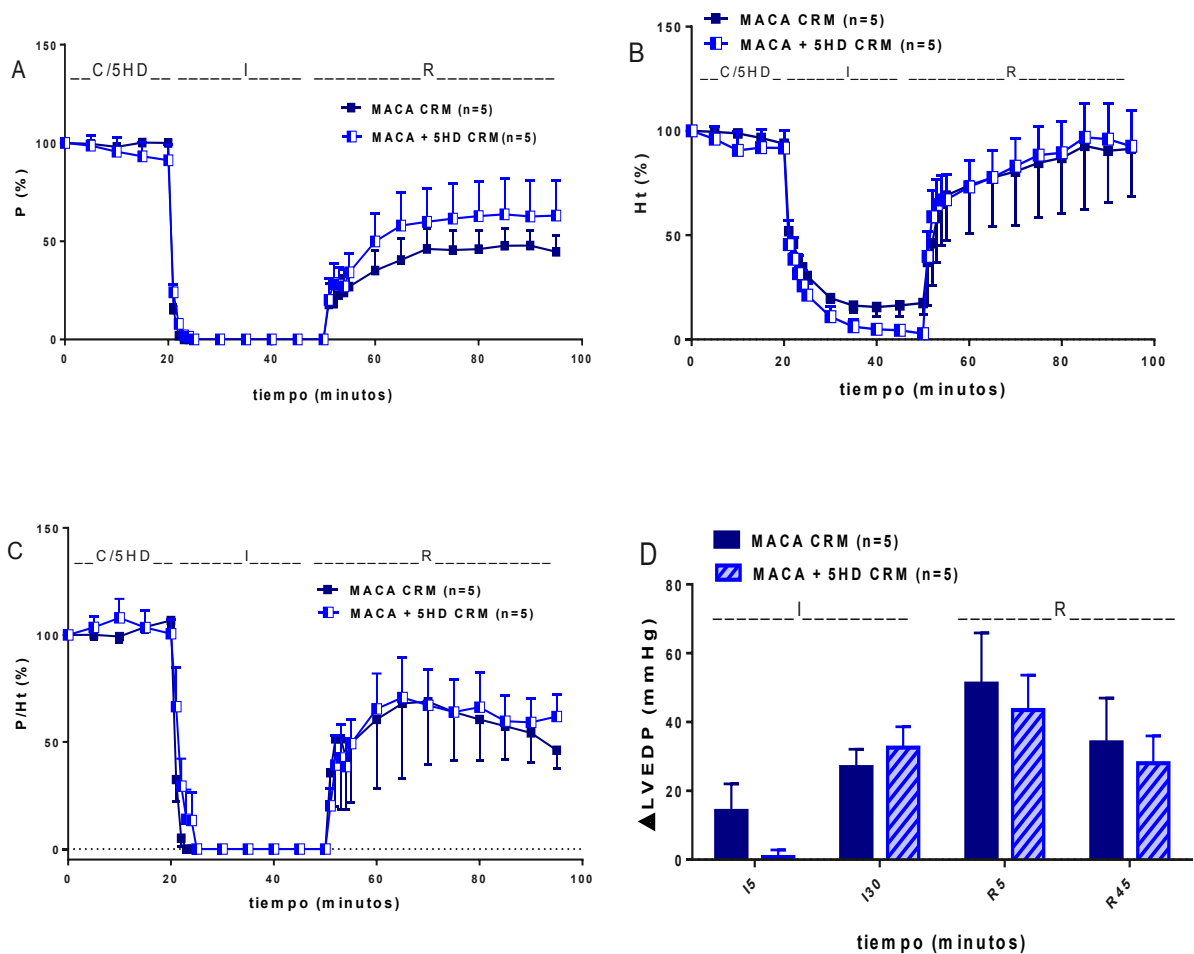


## **Rol de los canales mitocondriales de potasio (mKATP) en los efectos de la maca**

Para determinar si está implicada la activación de los canales mitocondriales mKATP en la cardioprotección de maca en I/R, se perfundió 100  $\mu\text{mol/l}$  de 5-hidroxidecanoato (5-HD) 15 minutos antes de la Isquemia. La Figura 25 muestra los resultados de la administración oral de maca 1g/kg/día en ratas macho jóvenes comparados con la intervención con 5-HD (inhibidor de los canales mKATP). Los valores absolutos iniciales de P, Ht y P/Ht se mostraron en la Tabla 1.

El 5-HD no afectó la cardioprotección de Maca frente al atontamiento severo producido por I/R en ratas macho, ya que no modificó significativamente la recuperación de la fuerza de contracción, del flujo de calor, de la economía muscular ni el patrón de  $\Delta\text{LVEDP}$  propio de la I/R (Figura 25).

Figura 25: Efectos de perfundir 100  $\mu\text{mol/l}$  5HD antes de la I/R en corazones de ratas macho jóvenes tratadas con maca 1 g/kg/día oral durante una semana. A) Máxima presión desarrollada en la contracción (P, como % del inicial). B) Flujo de calor (Ht como % del inicial). C) Economía muscular total (P/Ht en mmHg.g/mW como % del inicial). Y D) cambios en la presión diastólica ( $\Delta\text{LVEDP}$ ) durante la I (5 y 30 minutos) y la R (5 y 45 min) respecto del valor inicial. Ver estadística en tabla 2.



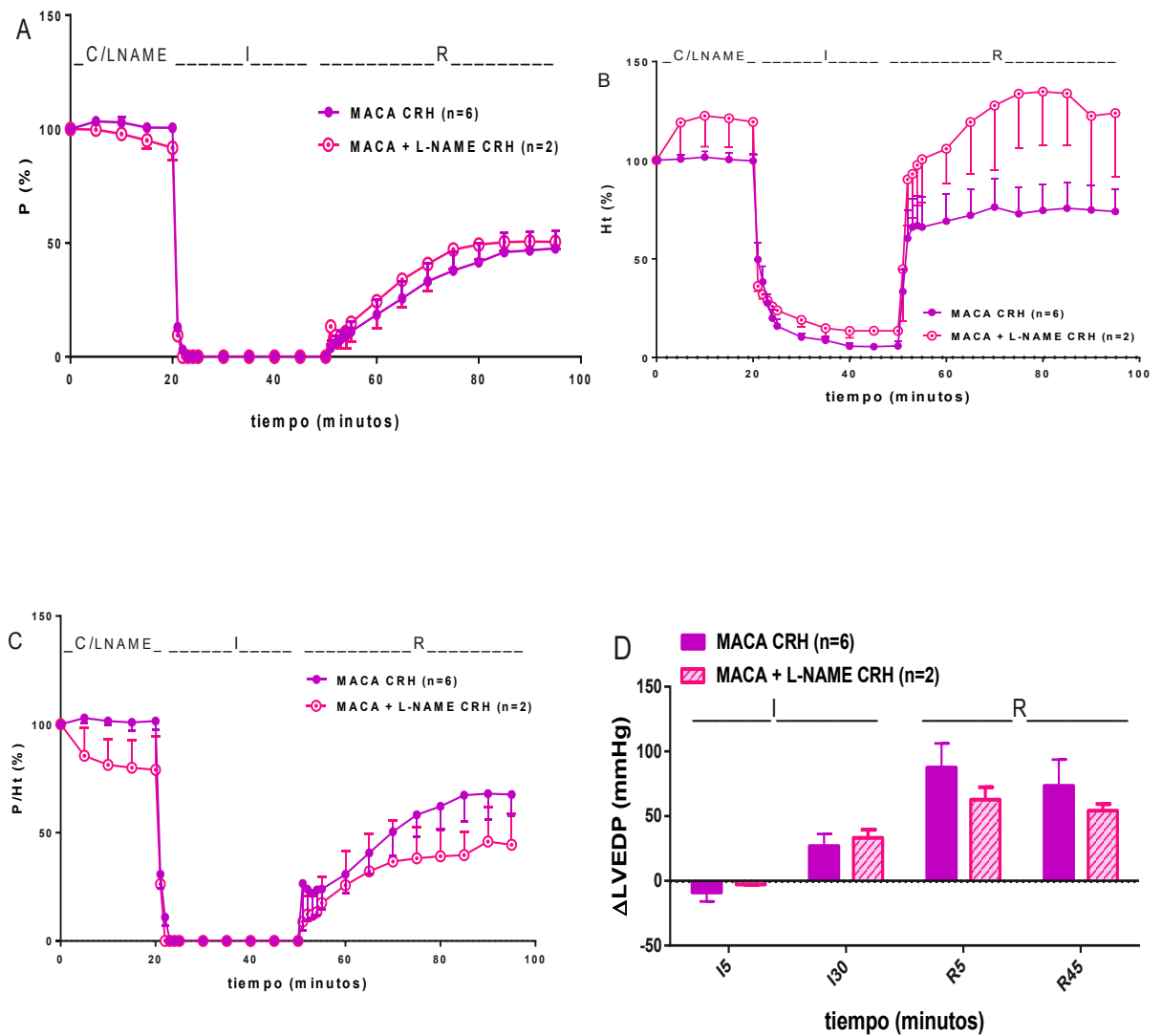
## **Rol de la NO-sintasa (NOS) en la cardioprotección de maca**

Para determinar si en la cardioprotección de la maca está implicada alguna de las vías que activan las NO sintasas, en corazones de ratas hembra tratadas con maca se perfundi6 el inhibidor de NOS, L-NAME, durante 15 minutos antes de la Isquemia.

En la Figura 26 se muestran los resultados de la perfusi6n de 100  $\mu\text{mol/l}$  de L-NAME en ratas hembra j6venes que recibieron administraci6n oral de maca 1g/kg/día en comparaci6n con los corazones que no recibieron el inhibidor de la NOS. Los valores absolutos iniciales de P, Ht y P/Ht se mostraron en la Tabla 1.

El L-NAME no alter6 significativamente la protecci6n de la maca frente a la injuria producida por I/R, ya que no modific6 la recuperaci6n porcentual de la fuerza de contracci6n (P), ni del flujo de calor (Ht), aunque tendi6 a reducir la economía muscular (P/Ht) y las contracturas diast6licas ( $\Delta\text{LVEDP}$ ) durante R (Figura 26).

Figura 26: Efectos de perfundir 100  $\mu\text{mol/l}$  L-NAME antes de la I/R en corazones de en ratas hembra jóvenes tratadas con maca 1 g/kg/día oral durante una semana. A) Máxima presión desarrollada en la contracción (P, como % del inicial). B) Flujo de calor (Ht como % del inicial). C) Economía muscular total (P/Ht en mmHg.g/mW como % del inicial). Y D) cambios en la presión diastólica ( $\Delta\text{LVEDP}$ ) durante la I (5 y 30 minutos) y la R (5 y 45 min) respecto del valor inicial. Ver estadística en tabla 4.



## **Efecto de la combinación de L-NAME y 5-hidrodecanoato (5-HD) en la cardioprotección de maca**

Considerando que podría existir un efecto cardioprotector sinérgico entre la vía de la NO sintasa y la activación de canales mKATP, se hipotetizó que el corazón podría compensar la inhibición de alguna de las vías con aumento de la otra vía cardioprotectora. Para evaluar esta hipótesis, se perfundieron ambos inhibidores en forma conjunta antes de la I/R. En la Figura 27 se muestran los resultados de la perfusión de ambos inhibidores, 5-HD y L-NAME en ratas hembra jóvenes tratadas con maca 1g/kg/día durante 1 semana. Los valores absolutos iniciales de P, Ht y P/Ht se mostraron en la Tabla 1.

La presencia conjunta de L-NAME y 5-HD redujo la cardioprotección de la maca frente al atontamiento severo producido por I/R. La Figura 27A muestra que durante R la recuperación de la fuerza de contracción (P) se redujo a valores no significativamente diferentes del grupo sin tratamiento (control), al igual que la economía muscular (P/Ht) (Figura 27B). La Figura 28 muestra que la recuperación del flujo de calor (Ht) no tuvo cambios (A), como tampoco la contractura diastólica ( $\Delta$ LVEDP) durante el ciclo I/R (B).

Figura 27: Efectos de perfundir 100  $\mu\text{mol/l}$  L-NAME + 100  $\mu\text{mol/l}$  5-HD, y de bloquear el mNCX con clonazepam 10  $\mu\text{mol/l}$  antes de la I/R en corazones de ratas hembra jóvenes tratadas con maca 1 g/kg/día. Se comparan con los grupos control y sólo tratado con maca. A) Máxima presión desarrollada en la contracción (P, como % del inicial). B) Economía muscular total (P/Ht como % del inicial). Ver ANOVA en tabla 4. Post-hoc Tukey tests: \*  $p < 0.05$  vs control;  $\sigma$   $p < 0.05$  vs MACA.

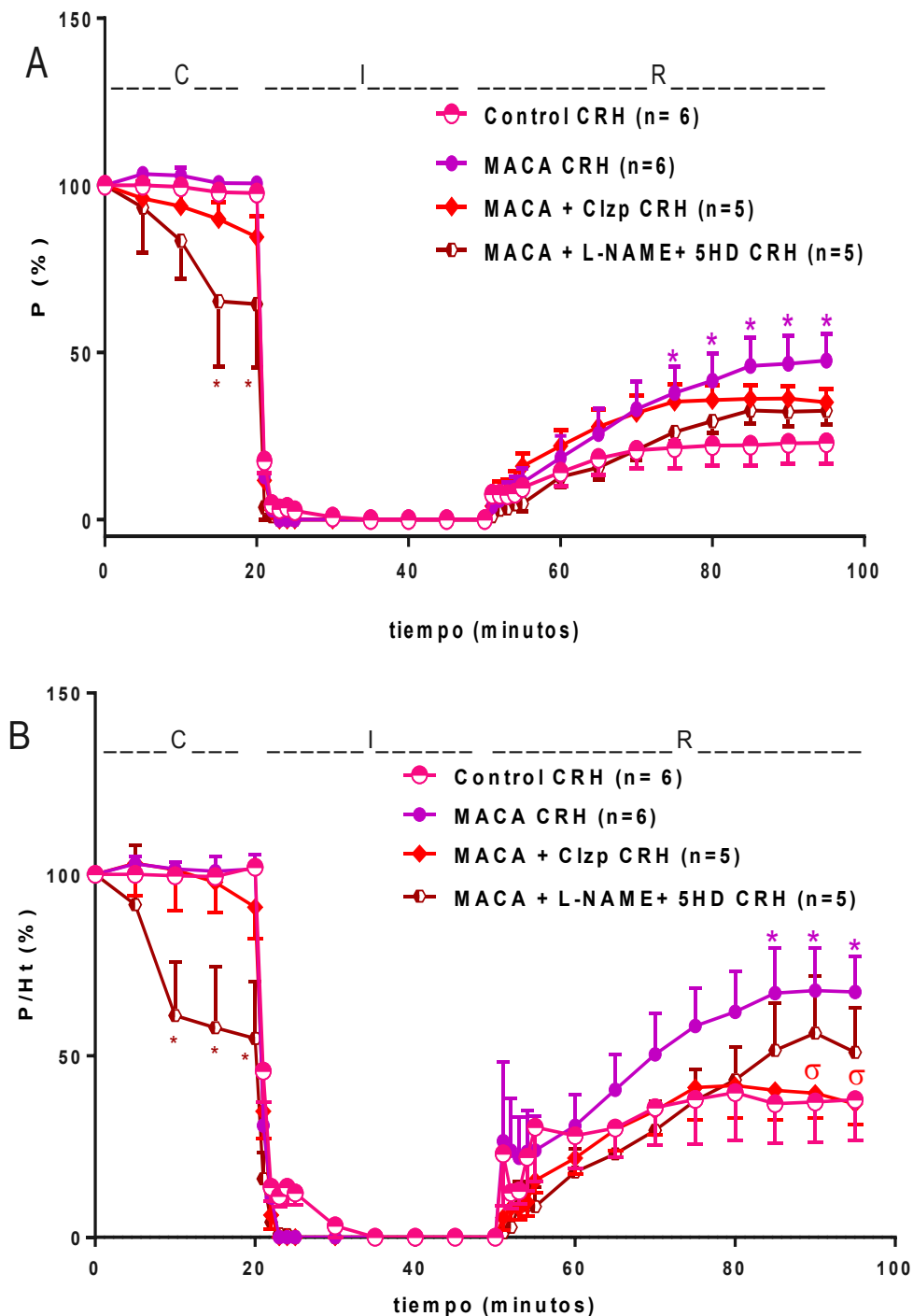
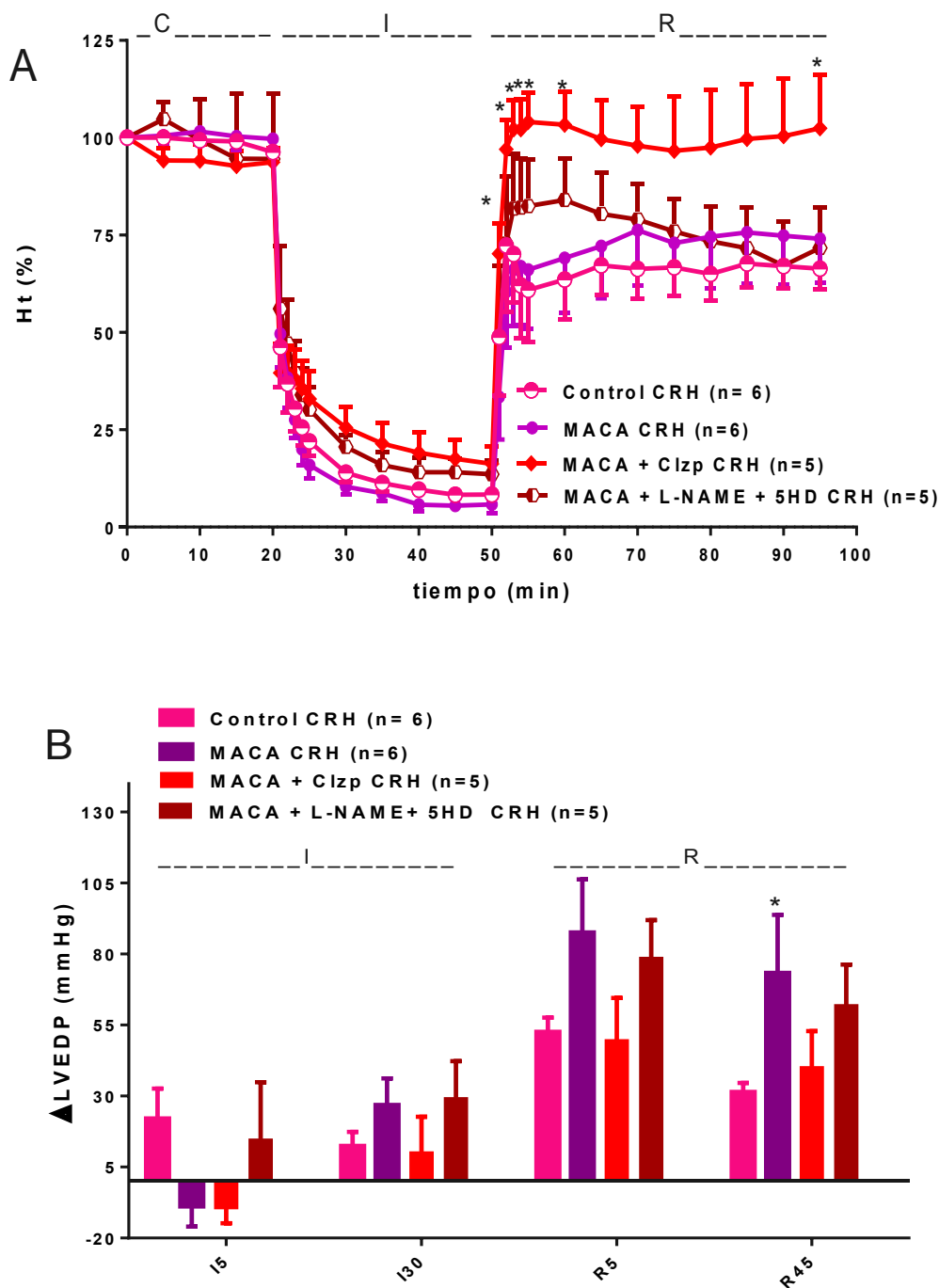


Figura 28: Efectos de perfundir 100  $\mu\text{mol/l}$  L-NAME + 100  $\mu\text{mol/l}$  5-HD, y del bloquear el mNCX con clonazepam 10  $\mu\text{mol/l}$  antes de la I/R en corazones de ratas hembra jóvenes tratadas con maca 1 g/kg/día oral durante una semana. Se comparan con los grupos control y sólo tratado con maca. A) Flujo de calor (Ht como % del inicial). B) cambios en la presión diastólica ( $\Delta\text{LVEDP}$ ) durante la I (5 y 30 minutos) y la R (5 y 45 min) respecto del valor inicial. Ver estadística en tabla 4. \*  $p < 0.05$  vs control.





## **Rol del intercambiador sodio por calcio mitocondrial (mNCX) en la cardioprotección de maca**

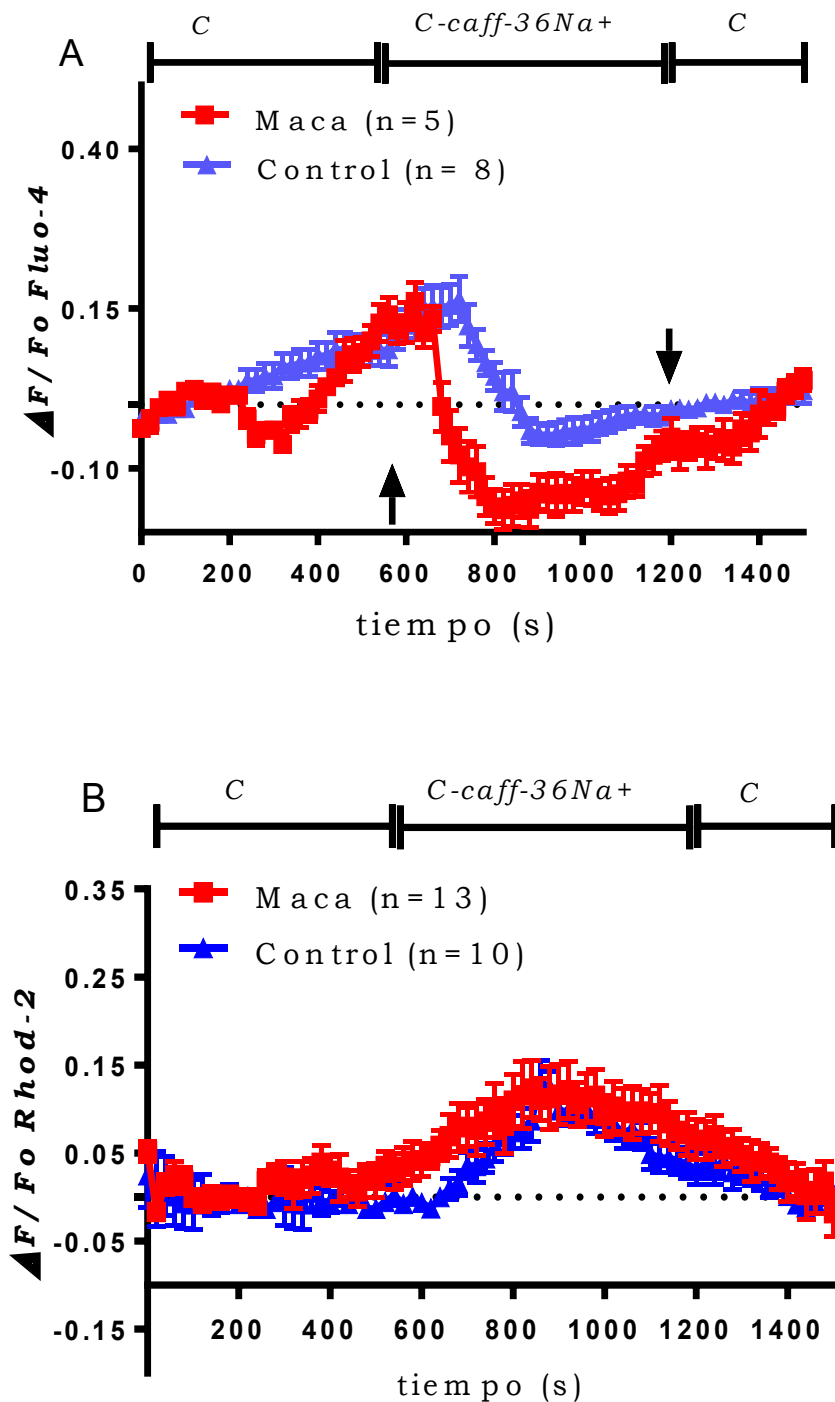
Se hipotetizó que la cardioprotección de maca podría deberse a que alivia la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial por estimular la extrusión vía el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (mNCX). Para determinar si este mecanismo ocurre, en corazones de rata hembra jóvenes tratadas con maca se bloqueó selectivamente el mNCX perfundiendo clonazepam  $10 \mu\text{mol/l}$  durante 15 minutos antes de la isquemia. En un trabajo previo se demostró que esta intervención no modifica significativamente la recuperación mecánico-energética en corazones de rata sin tratamiento y expuestos a este modelo de I/R (Ragone y col., 2020). La Figura 27 A muestra que la cardioprotección de maca fue reducida levemente con clonazepam, ya que los valores de P (%) resultaron no diferir significativamente de los del grupo control, y alejarse de los del grupo de maca al final de R. El efecto de clonazepam es más notorio en la economía muscular (P/Ht) que recuperó igual al grupo control, y significativamente menos que el grupo tratado con maca (Figura 27 B). La Figura 28 muestra que clonazepam aumentó la recuperación porcentual de Ht (A), que resultó significativamente mayor al grupo de maca. La contractura diastólica durante R ( $\Delta\text{LVEDP}$ ), no fue significativamente diferente del grupo control, y menor al de maca (Figura 28 B). Los valores absolutos iniciales de P, Ht y P/Ht se muestran en la Tabla 1.

## **Efectos de maca en los niveles de calcio de cardiomiocitos aislados de corazón de rata**

La Figura 29 muestra los efectos del tratamiento oral con maca en cardiomiocitos aislados de rata macho en reposo y no expuestos a I/R. En la parte A se observa que maca aceleró ligeramente la caída en la señal  $\Delta F/F_0$  de Fluo-4 (estima la  $[Ca^{2+}]$  citosólico) que sigue al aumento provocado por la liberación de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplásmico por la perfusión de Krebs con 10 mM cafeína y 36 mM  $Na^+$ . En la parte B se observa que maca también aceleró ligeramente el aumento en la señal  $\Delta F/F_0$  de Rhod-2 (estima la  $[Ca^{2+}]$  mitocondrial) provocado por la perfusión de Krebs con 10 mM cafeína y 36 mM  $Na^+$ .

Los resultados sugieren que en condición inicial de reposo, la maca facilita ligeramente la remoción de  $Ca^{2+}$  citosólico por las mitocondrias.

Figura 29: Efectos del tratamiento oral con maca en los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (estimado por la señal  $\Delta F/\text{Fo}$  de Fluo-4, en A) y de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (por  $\Delta F/\text{Fo}$  de Rhod-2 en B) de los cardiomiocitos aislados de rata en reposo y perfundidos con Krebs control (C) seguido de Krebs con 10 mM cafeína y 36 mM Na (C-caff-36Na), y nuevamente C.



## **Discusión**

Esta Tesis de Maestría ha evaluado por primera vez los efectos de la administración oral de la harina de la maca (*Lepidium meyenii*) en la función contráctil y energética cardíaca antes y durante un episodio de isquemia y reperfusión. Los resultados demuestran que el tratamiento oral durante una semana, a la dosis de 1 g/kg/día resultó cardioprotector en ratas adultas jóvenes de ambos sexos. Sin embargo, no se observó una protección significativa en ratas hembra seniles.

Entre los componentes de la harina de la raíz de maca se cuentan algunas isoflavonas como la genisteína (78% del total de isoflavonas), la daidzeína (1.4%) y el glucósido genistina (19%). Esto nos permitió hipotetizar que la maca podría generar cardioprotección comparable a la que produce genisteína. Sin embargo, la administración aguda de una única dosis de 5 mg/kg de genisteína vía intraperitoneal (i.p.) fue más cardioprotectora en ratas macho que en ratas hembra adultas jóvenes tanto en un modelo de hipoperfusión/reperfusión (Colareda y Consolini, 2018) como en el modelo de I/R similar al empleado en esta Tesis (Colareda y col., 2020). En cambio, el tratamiento oral con maca durante una semana fue cardioprotector en los dos géneros, aunque la recuperación fue más rápida en la reperfusión de los corazones de rata macho que en los de hembras, especialmente en la economía muscular total (P/Ht). Comparando los valores basales previos a la I/R, maca aumentó la P en corazones de rata hembra y la redujo en los de macho, tendiendo en ambos a mejorar la economía (P/Ht) en valores similares entre ellos (Tabla 1). Otra diferencia de género que se encontró fue que los corazones de las ratas macho tratadas con maca exhibieron mayor velocidad en las fases de contracción (+P/P) y de relajación (-P/P) que los

controles, tanto antes como después de la isquemia (reperfusión). Estos efectos en las velocidades y en la economía muscular (P/Ht) sugieren que la maca estimula la rápida liberación y retoma de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, y que genera una contracción más eficiente en corazones de rata macho que en los de hembra. La genisteína y otras isoflavonas son considerados fitoestrógenos porque se unen a receptores estrogénicos, pero con menor potencia que el beta-estradiol endógeno (Suetsugi y col., 2003). Esto sugiere que podrían comportarse como agonistas parciales de los receptores estrogénicos, por lo cual estimularían a los receptores a niveles bajos de estradiol generando efectos similares a éste o aditivos, pero pueden competir con ellos a niveles altos desencadenando un menor efecto. Este comportamiento podría explicar porqué la cardioprotección de la maca es más importante en corazones de ratas macho que en los de rata hembra.

También aparecen diferencias en el comportamiento de genisteína y de maca en ratas hembra seniles. Mientras una dosis i.p. de 3 mg/kg de genisteína incrementó la recuperación de P desde un 13 a un 64 % al final de la perfusión (Colareda y col., 2020), la maca oral redujo mucho la P basal previa a la I/R, y no logró mejorar la recuperación contráctil ni de la economía (P/Ht). Estos resultados sugieren que en la maca no se observa el mayor efecto en condiciones de deficiencia estrogénica, como sí aparece en la administración de genisteína. Y puesto que el comportamiento de maca fue diferente en corazones de rata macho, se sugiere que podrían participar otros mecanismos de cardioprotección, no exclusivamente vinculados a receptores estrogénicos, y que estarían atenuados con la senilidad. En relación a esto, los corazones de rata hembra seniles recuperan menos en la

postisquemia que las jóvenes, con mayor contractura diastólica, en este modelo de I/R severa (Colareda y col., 2020). Eso está relacionado a una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, puesto que la recuperación de los corazones de rata seniles mejoró con diazóxido, un abridor de los canales de  $\text{K}^+$  dependientes de ATP mitocondriales (mKATP) (Colareda y col., 2020). En este modelo, aún los corazones de rata joven sufren la activación del poro de transición mitocondrial sensible a ciclosporina (mPTP) durante R, consecuente a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ragone y col., 2020). Por ello, es de esperar que las ratas seniles agraven esta sobrecarga y apertura del mPTP. Estos resultados están de acuerdo con otros que encontraron un aumentado “leak” de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS en corazones seniles expuestos a I/R, con un mayor contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  en las mitocondrias interfibrilares (Ruiz-Meana y col., 2019). En corazones de conejo la senilidad incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondrial, origina la tiol-oxidación del RyR2 y activa su hiperactividad (Cooper y col., 2013; Hamilton y Terentyev, 2019). Además, hay una capacidad reducida para mantener el balance redox y acumulación de ROS en mitocondrias (Chaudhary y col., 2011), así como una menor captación de calcio mitocondrial (Fernández-Sanz y col., 2014), respecto de las ratas jóvenes. Además, se demostró que el envejecimiento y la deficiencia estrogénica en ratas expuestas a I/R son aditivas, puesto que afectan la respiración respectivamente en mitocondrias subsarcolemales e interfibrilares (Garvin y col., 2017). En consecuencia, considerando que en ratas seniles en I/R habrá una mayor producción de ROS mitocondrial que en las jóvenes, sería esperable que un compuesto antioxidante fuera menos efectivo en ratas seniles que en las jóvenes. Según se explicó en la

Introducción, maca contiene compuestos fenólicos que suelen tener actividad antioxidante, por lo cual esta podría ser una de las causas de la pérdida de cardioprotección de la maca en ratas seniles. Se deberán hacer otros estudios para comprobar esta hipótesis.

Otro aspecto interesante de los resultados es que a pesar de la cardioprotección postisquémica (en P y P/Ht), en ambos grupos de corazones de rata macho y hembra, la maca incrementó la contractura diastólica en la reperfusión. Por el contrario, en corazones de rata seniles sin cardioprotección la maca redujo la contractura diastólica ( $\Delta$ LVEDP) durante R. Este resultado es paradójico, porque el aumento de la contractura diastólica es perjudicial, pero sugiere que el incremento de la recuperación mecánico-energética podría deberse a un mayor nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico (RS). Análogamente, la genisteína también incrementó la contractura diastólica durante R en corazones de rata macho pero la redujo en los de hembra seniles (Colareda y Consolini, 2018; Colareda y col. 2020). Ese efecto de genisteína se corresponde con los reportados aumentos de la captación de  $\text{Ca}^{2+}$  del RS y sensibilidad de miofilamentos al  $\text{Ca}^{2+}$ , y la reducción del eflujo por el NCX (Liew y col., 2004; Li y col., 2008). En los resultados de esta Tesis en cardiomiocitos sin isquemia (Figura 29), el tratamiento oral con maca tendió a incrementar la velocidad de captación mitocondrial de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el citosol, lo cual ayudaría a reducir el incremento del tono diastólico. Se debe considerar además que la exposición a la I/R activa los canales de RyR2, generando un “leak” de  $\text{Ca}^{2+}$  responsable de la mayor contractura diastólica en R, y que la senilidad afecta varias vías que regulan la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , como RyR2 y SERCA2a, ya sea por



reducción de su nivel proteico o modificaciones post-traduccionales (Hamilton y Terentyev, 2019). Estos mecanismos explican la reducción de la contractura diastólica en la R de corazones seniles tratados con maca. Además, refuerzan la hipótesis de que la maca podría estimular la captación de calcio por el RS y por las mitocondrias, mejorando el acoplamiento con el metabolismo y síntesis de ATP. En corazones de rata joven, todo esto mejoraría la recuperación del transitorio en la reperfusión y la economía muscular, acompañado por un “leak” diastólico.

Analizando el origen de las diferencias de efecto cardioprotector entre la maca y la genisteína, surge que mientras la genisteína actúa como tal por haber sido administrada vía parenteral (i.p.), la maca puede sufrir el metabolismo de las isoflavonas al ser administrada por vía oral. Se ha reportado que la genisteína y la daidzeína se metabolizan por enzimas colónicas, dando como resultado derivados como el equol y el 5-hidroxi-equol, respectivamente (Sánchez-Calvo y col., 2013). Estos compuestos tienen mayor actividad fitoestrogénica que las isoflavonas precursoras, y también mayor actividad antioxidante preventiva de daño epitelial y ateromatoso (Setchell y Clereci, 2010). Sin embargo se considera que sólo un 30-50% de los individuos poseen las enzimas para convertir las isoflavonas en equol (Atkinson y col., 2004). En estudios clínicos se encontró que solo el 20-30% de los individuos occidentales pueden producir S-equol a partir de daidzeína, en contraste con el 50-70% de los asiáticos (Hodis y col., 2011). Esto remarca la importancia de la flora intestinal y explica cierta falta de cardioprotección de isoflavonas de soja en trabajos realizados en América del Norte (Hodis y col., 2011). Además se ha demostrado que S-equol y no las

isoflavonas de la dieta posee una relación inversa con el desarrollo de enfermedad cardíaca coronaria (Zhang y col., 2012). La presencia de otro tipo de bacterias puede catalizar la conversión de las isoflavonas en desmetilangolensina (O-DMA), y 6'-hidroxi-O-DMA, que son inactivos y producidos a partir de dihidrodaidzeína y dihidrogenisteína (Sánchez-Calvo y col., 2013). La variación en el metabolismo gastrointestinal podría contribuir a las diferencias observadas en rata entre los efectos de genisteína y de la harina de maca.

En consecuencia, otro factor que podría contribuir a la falta de cardioprotección de maca en ratas seniles podría asociarse a que el envejecimiento reduce la absorción de nutrientes, pudiendo afectar el metabolismo y el ciclo enterohepático de las isoflavonas. El hecho de que la senilidad modifica la flora intestinal en ratas (Sun y col., 2018) podría disminuir la producción de equol y 5-hidroxi-equol, los compuestos con mayor actividad.

Considerando que la harina de maca contiene las isoflavonas genisteína, daidzeína y gliciteína, la hipótesis que se evaluó fue que la acción cardioprotectora se debía a estos compuestos y por lo tanto respondía al mismo mecanismo de acción. Recientemente se demostró que el efecto cardioprotector de una dosis de genisteína 5 mg/kg vía i.p., en el mismo modelo de I/R empleado en esta Tesis, no se debía a la propiedad inhibitoria de tirosina-quinasas de ese compuesto, sino a la capacidad de estimular algunas vías intracelulares (Colareda y col. 2020). Las vías asociadas a los receptores estrogénicos ER $\alpha$ , ER $\beta$ , y GPCR incluyen la secuencia de proteína-quinasa C (PKC $\epsilon$ ) y activación de los canales mKATP como un

mecanismo cardioprotector en la I/R (Deschamps, 2010; Korzick y Lancaster, 2013; Fukumoto y col., 2013). Las vías activadas por genisteína en la cardioprotección fueron la activación de PKC y la apertura de canales mKATP, los cuales previenen la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (Colareda y col., 2020). Como se explicó antes, en este modelo de I/R cuya recuperación contráctil post-isquémica es de alrededor del 15% de la P inicial, se produce la apertura del poro de transición de permeabilidad (mPTP) y los mKATP no se activan (Ragone y col., 2020). Considerando que genisteína y maca aumentan la recuperación contráctil y de economía post-isquémica, ambas están previniendo la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y la apertura del mPTP. Se hipotetizó que la maca induciría igual mecanismo que su principio activo genisteína. Sin embargo, la acción cardioprotectora de maca no fue reducida por el bloqueo de las PKC con celeritrina ni por el bloqueo de los canales mKATP con 5-HD, indicando que no involucra la activación de estas vías, a diferencia de genisteína. Alternativamente, podría ser que ese mecanismo participe minoritariamente y al inhibirlo sea compensado por otro mecanismo cardioprotector de genisteína o de otros componentes.

Se hipotetizó entonces que, al igual que los estrógenos, la maca podría activar a las NO-sintasas, considerando que la eNOS produce niveles de NO que S-nitrosilan varias proteínas celulares. Las consecuencias son la inhibición de canales  $\text{Ca}^{2+}$ -L, del complejo I mitocondrial productor de ROS, y de la apertura del mPTP, las cuales conducen a la cardioprotección (Sun y col., 2006). Si bien genisteína no demostró actuar por este mecanismo (Colareda y col., 2020), se hipotetizó que la maca podría estimular esa vía cardioprotectora dada la presencia de otros principios activos. Sin embargo,

la perfusión de L-NAME, un inhibidor de dichas enzimas, no impidió la cardioprotección de maca. Se pensó entonces que podría haber un sinergismo entre dos mecanismos que evitan la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial, como son la apertura de los mKATP y la formación de NO. De ese modo, la inhibición de alguno de ellos podría compensarse por la capacidad del otro para proteger a las mitocondrias. Para evaluarlo se inhibieron en simultáneo ambos mecanismos protectores, encontrando una inhibición parcial del efecto cardioprotector de la maca evidenciado por una reducción de P y P/Ht durante R (Figura 27). En un modelo diferente, de ratas ovariectomizadas y tratadas durante un mes con isoflavonas de soja se describió que la cardioprotección contra el infarto se debe a una activación de la eNOS y disminución de marcadores del estrés oxidativo (Tang y col., 2016). Si bien hay diferencias en el rol de NOS entre ese resultado y los obtenidos en la presente Tesis con maca, éstas se basan en el grado de injuria aplicado en cada modelo, una menor dosis de isoflavonas presentes en la harina de maca que en la soja, y/o la duración de los respectivos tratamientos. En el modelo de I/R que se empleó en esta Tesis no se produce un grado de infarto significativo, aun en condición control sin tratamiento, el cual recupera durante R hasta un 15% de la contractilidad inicial (Ragone y col., 2020).

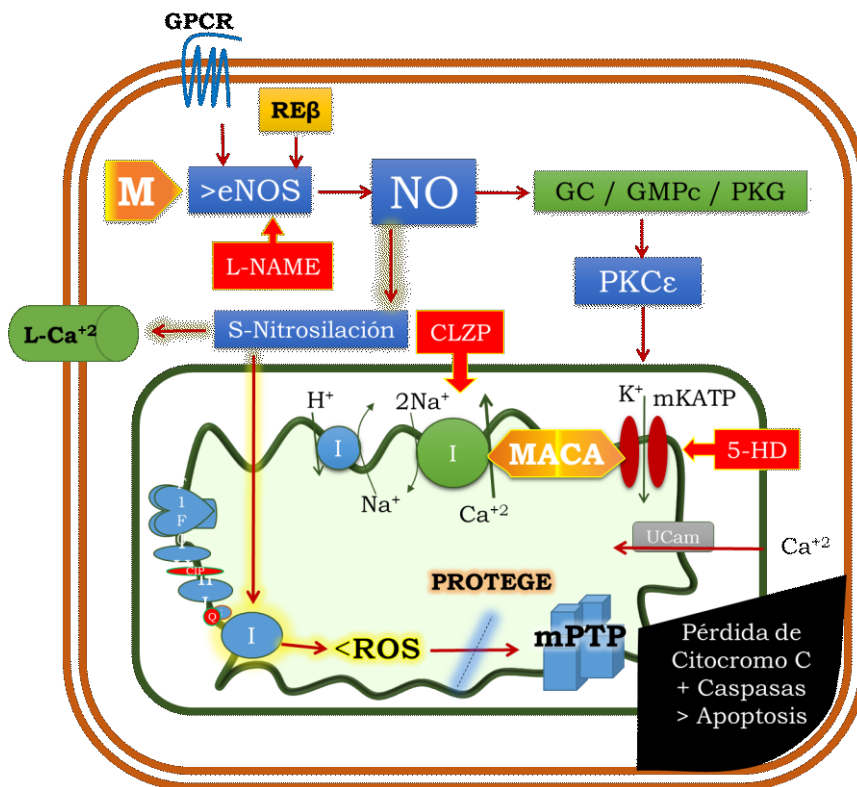
Considerando que las mitocondrias pueden aliviar su sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  por la vía de extrusión mediante el mNCX, se evaluó si la maca podría incrementar ese mecanismo, para lo cual se lo bloqueó con clonazepam que actúa selectivamente a la dosis de 10  $\mu\text{M}$  (Cox y Matlib, 1993). En el mismo modelo de I/R en rata no tratada, esta droga no modifica la recuperación

postisquémica, pero en el hipotiroidismo redujo la cardioprotección, evidenciando que estaba aumentada la extrusión de  $\text{Ca}^{2+}$  vía mNCX (Ragone y col., 2020). En los corazones de ratas hembra tratados con maca oral, clonazepam redujo parcialmente la recuperación contráctil (P) y la economía (P/Ht) al final de la reperfusión llevándolos a valores no significativamente diferentes del control (Figura 27), y aumentó el flujo de calor total (Figura 28 A). Esto se explica porque la inhibición del mNCX aumenta la concentración de calcio mitocondrial, y eso origina una activación del metabolismo con el consiguiente incremento del Ht. La inhibición de la extrusión de Ca mitocondrial también explica la reducción de la contractura diastólica ( $\Delta\text{LVEDP}$ ). Los resultados sugieren que al mecanismo cardioprotector de maca también contribuye la estimulación del mNCX, previniendo la sobrecarga de calcio mitocondrial.

Los resultados sugieren que puede existir otro mecanismo que contribuya a la cardioprotección de la maca, diferente a los aquí evaluados, y que se mantiene aun cuando se bloqueen NOS, mKATP, mNCX y PKC. Considerando los antecedentes descritos hasta ahora para las isoflavonas de soja, se hipotetiza que podrían ser mecanismos antioxidantes los responsables de la cardioprotección. Si bien no se registró una actividad antioxidante importante con el método de DPPH en la muestra de harina de maca, podríamos pensar que tal actividad se incrementaría con el metabolismo intestinal de las isoflavonas. Como se discutió antes, si la maca indujera una posible actividad antioxidante, ésta podría resultar insuficiente en los corazones seniles con excesiva producción de ROS que induce mayor

sobrecarga de calcio, explicando la pérdida de la cardioprotección. Se necesitan futuros estudios para evaluar estas hipótesis.

Figura 30: Interpretación de las vías de protección de la harina de raíz de maca, en base a los resultados obtenidos. Se sugiere un sinergismo de activación de Maca (M) sobre eNOS, mNCX y mKATP, lo cual permite a la célula isquemiada evitar la apertura del mPTP, y la pérdida de metabolitos como citocromo C, que conducen a la disfunción, de diversos grados con la eventual activación de Caspasas y posterior Apoptosis celular.



## **Conclusiones**

Esta Tesis demuestra por primera vez un efecto cardioprotector de la administración oral diaria de la harina de maca (*Lepidium meyenii*) a ratas, evaluado en un modelo de isquemia/reperfusión con atontamiento cardíaco severo. El efecto consistió en la mejora de la recuperación contráctil y de la economía muscular (P/Ht) durante la reperfusión, tanto en ratas macho como en hembras, aunque la acción fue más importante en machos. Si bien la maca contiene isoflavonas, se perdió el efecto cardioprotector en ratas hembras seniles, propio del tratamiento agudo con la isoflavona genisteína. Mediante inhibidores selectivos, se demostró que en la cardioprotección de maca participan varios mecanismos sinérgicos que se complementan, como la activación de la NOS, de los canales mKATP y del mNCX. Éstos reducen la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial y la apertura del mPTP. Pero el mecanismo cardioprotector se eliminó con el envejecimiento, pudiendo relacionarse con el hecho de que la senilidad aumenta la producción de ROS mitocondrial reduciendo la efectividad de principios activos antioxidantes. Además, el envejecimiento reduce la absorción de nutrientes, el metabolismo y la consecuente producción de metabolitos de isoflavonas más activos, durante la administración oral subaguda de la maca. Este estudio da una base científica preclínica para una futura evaluación clínica del uso de este alimento nutracéutico en la prevención del riesgo isquémico cardíaco.



## Bibliografía

- Agama-Acevedo E., Ottenhof M.A., Farhat I.A., Paredes-López O., Ortiz-Cereceres J., Bello-Pérez L.A. (2005). Aislamiento y caracterización del almidón de maíces pigmentados. *Agrociencia*. 39, 419-429.
- Albert C., Ford D. (1999). Protein kinase C translocation and PKC dependent protein phosphorylation during myocardial ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 276, H642-H650.
- Álvarez C.J. (1993). Utilización de diferentes niveles de Maca en la fertilidad de cobayos [Tesis de Bachiller]. Pasco, Perú: Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión.
- Andrukhiv A., Costa A.D., West I.C., Garlid K.D. (2006). Opening mitoKATP increases superoxide generation from complex I of the electron transport chain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291, H2067–H2074.
- ANMAT (13 de mayo de 2016). Disposición N° 5323. Expediente N° 1-47-2110-000042-16-1. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud.
- ANMAT. Código Alimentario Argentino. Rec. el 11 de Octubre de 2019, Argentina.gob.ar: <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>
- ANMAT. (2015). Disposición 5418/15 Anexo IV. Argentina.
- ANMAT. Glosario fitoterápicos. Obtenido de [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/mercosur/pdf\\_files/01ag\\_coprosal/AGREGADO\\_VII\\_Glosario\\_Fitoterapicos.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/mercosur/pdf_files/01ag_coprosal/AGREGADO_VII_Glosario_Fitoterapicos.pdf)
- ANMAT. Suplementos Dietarios-Hierbas.pdf. Rec. el 11 de octubre de 2019, de [http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Suplementos\\_Dietarios-Hierbas.pdf](http://www.anmat.gov.ar/Alimentos/Suplementos_Dietarios-Hierbas.pdf)
- Arenas P.M., Cristina I., Puentes J.P., Buet Constantino F., Hurrell J.A., Pochettino M.L. (2011). Adaptógenos: plantas medicinales tradicionales comercializadas como suplementos dietéticos en la conurbación Buenos Aires- La Plata (Argentina). *Bonplandia*, 20 (2), 251-264.
- Atkinson C., Berman S., Humbert O., y Lampe J.W. (2004). In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production. *J. Nutr.* 134, 596-599.
- Axelson M., Setchell K.D.R. (1980). Conjugation of lignans in human urine. *FEBS Lett.* 12, 49–53.
- Axelson M., Sjøvall J., Gustafsson B., Setchell K.D.R. (1984). Soya-- a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in humans and animals. *J. Endocrinol.* 102, 49–56.
- Baines C.P. (2009). The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic. Res. Cardiol.* 104,181-188.

- Baines C.P., Goto M., Downey J.M. (1997). Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 29, 207–216.
- Baines C.P., Song C.X., Zheng Y.T., Wang G.W., Zhang J., Wang O.L., Guo Y., Bolli R., Cardwell E.M., Ping P. (2003). Protein kinase C epsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ. Res.* 92, 873–880.
- Baines C.P., Zhang J., Wang G.W., Zheng Y.T., Xiu J.X., Cardwell E.M., Bolli R., Ping P. (2002). Mitochondrial PKC epsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ. Res.* 90, 390–397.
- Balafanova Z., Bolli B., Zhang J., et al. (2002). Nitric oxide (NO) induces nitration of protein kinase C $\epsilon$  (PKC $\epsilon$ ), facilitating PKC $\epsilon$  translocation via enhanced PKC $\epsilon$ -RACK2 interactions: a novel mechanism of NO-triggered activation of PKC $\epsilon$ . *J. Biol. Chem.* 277, 15021–15027.
- Bannwart C., Adlercreutz H., Fotsis T., Wahala K., Hase T., Brunow G. (1984). Identification of O-desmethylangolensin, a metabolite of daidzein, and of matairesinol, one likely plant precursor of the animal lignan enterolactone, in human urine. *Finn. Chem. Lett.* 4 (5), 120–125.
- Baoliang C., Bo L., Kan H., Qun Y. (2003). Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*. *Journal of Natural Products.* 66, 1101-1103.
- Bassols G., Gurni A., Rivas M., Vignale N.D. (2010). Micrografía analítica de raíces de *Lepidium meyenii* (Brassicaceae). *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Aromat.* 9 (6), 440-445.
- Bernardi P., Di Lisa F. (2015). The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 78, 100-106.
- Bers D.M. (2001). *Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force.* Dordrecht, Neth.: Kluwer Acad. 2nd ed.
- Bers D.M. (2002). Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415, 198–205.
- Bogani P., Simonini F., Iriti M., Rossoni M., Faoro F., Poletti A., et al (2006). *Lepidium meyenii* (maca) does not exert direct androgenic activities. *J. Ethnopharmacol.* 104, 415-417.
- Bolli R. (2001). Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33, 1897–1918.
- Bolli R., Marbán E. (1999). Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol. Rev.* 79, 609-634.

- Bonazzola P., Ragone M.I., Consolini A.E. (2014). Effects of pyruvate on the energetics of adult rat hearts exposed to ischemia/reperfusion. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 92, 386–398.
- Bordoni A., Hreliaa S., Angelonia C., Giordanob E., Guarnierib C., Caldarerab C.M., Biagi P.L. (2002). Green tea protection of hypoxia/reoxygenation injury in cultured cardiac cells. *Journal of Nutritional Biochemistry.* 13, 103–111.
- Braden A.W.H., Hart N.K., Lamberton J.A. (1967). The estrogenic activity and metabolism of certain isoflavones in sheep. *Aust J Agric Res.* 18, 335–348.
- Brooks N.A., Wilcox G., Walker K.Z., Ashton J.F., Cox M.B., Stojanovska L. (2008). Beneficial effects of *Lepidium meyenii* (Maca) on psychological symptoms and measures of sexual dysfunction in postmenopausal women are not related to estrogen or androgen content. *Menopause.* 15(6), 1157–1162.
- Burwell L.S., Nadtochiy S.M., Tompkins A.J., Young S., Brookes P.S. (2006). Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochem. J.* 394, 627–634.
- Carreira R.S., Facundo H.T.S., Kowaltowski A.J. (2005). Mitochondrial K<sup>+</sup> transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion. *Braz. J. Med. Res.* 38, 345–352.
- Chaudhary K.R., El-Sikhry H., Seubert J.M. (2011) Mitochondria and the aging heart. *J. Geriatr. Cardiol.* 8(3), 159–167.
- Chen Q., Camara A.K., Stowe D.F., Hoppel C.L., Lesnefsky E.J. (2007). Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292, C137–C147.
- Choi E.H., Kang J.I., Cho J.Y., Lee S.H., Kim T.S., Yeo I.H., *et al.* (2012). Supplementation of standardized lipid-soluble extract from maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats. *J. Funct. Foods.* 4, 568–573.
- Chung F., Rubio J., Gonzales C., Gasco M., Gonzales G.F. (2005). Dose-response effects of *Lepidium meyenii* (Maca) aqueous extract on testicular function and weight of different organs in adult rats. *J. Ethnopharmacol.* 98(1-2), 143–147.
- Cieza de León P. (1988). *La crónica del Perú*. PEISA, Lima, Perú.
- Ciocci Pardo A., Scuri S., González Arbeláez L.F., Caldiz C., Fantinelli J., Mosca S.M. (2018). Survival kinase-dependent pathways contribute to gender difference in the response to myocardial ischemia-reperfusion and ischemic post-conditioning. *Cardiovasc. Pathol.* 33, 19–26.
- Cobo B. (1890). *Historia del nuevo mundo (Vol. I)*. Sevilla: Sociedad de Bibliófilos Andaluces.
- Colareda G.A. (2016). Efectos de la genisteína en varios modelos de isquemia-reperfusión cardíaca mediante estudio mecánico-energético. Tesis Doctoral. Facultad de Cs. Exactas, Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Acta 1678.

- Colareda G.A., Consolini A.E. (2018). Low-flow ischemia and reperfusion in rat hearts: energetic of stunning and cardioprotection of genistein. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 70(9), 1174-1187.
- Colareda G.A., Ragone M.I., Bonazzola P., Consolini A.E. (2020). The mKATP channels and PKC are involved in the cardioprotective effects of genistein on estrogen-deficient rat hearts exposed to ischemia/reperfusion: energetic study". *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 75(5), 460-474.
- Colareda G.A., Ragone M.I., Consolini A.E. (2016). Sex differences in the mechano-energetic effects of genistein on stunned rat and guinea pig hearts. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 43(1), 102-115.
- Cole W.C., Pherson C.D., Sontag D. (1991). ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ. Res.* 69, 571-581.
- Comba, N.Z. (2010). Isoflavonas de Soja: Un nuevo nutracéutico. Recuperado el 06 de diciembre de 2018, de Editorial Universitaria de la Universidad Tecnológica Nacional-UTN-Argentina:  
[http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal\\_frvm/CyTAL\\_2010/Trabajos%20y%20Prologo/Trabajos%20CyTAL%202010/TF%20-%200009%20-%20%20Isoflavonas%20de%20Soja.pdf](http://www.edutecne.utn.edu.ar/cytal_frvm/CyTAL_2010/Trabajos%20y%20Prologo/Trabajos%20CyTAL%202010/TF%20-%200009%20-%20%20Isoflavonas%20de%20Soja.pdf)
- Consolini A.E., Márquez M.T., Ponce-Hornos J.E. (1997). Energetics of heart muscle contraction contraction under high K<sup>+</sup> perfusion: verapamil and Ca<sup>2+</sup> effects. *Am. J. Physiol.* 273, H2343-H2350.
- Consolini A.E., Márquez M.T., Ponce-Hornos J.E. (2001). A comparison no-flow and low-flow ischemia in the rat heart: an energetic study. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 79, 551-558.
- Consolini A.E., Ragone M.I., Bonazzola P. (2011) Mitochondrial and cytosolic calcium in rat hearts under high-K<sup>(+)</sup> cardioplegia and pyruvate: mechano-energetic performance. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 89, 485-496.
- Consolini A.E., Ragone M.I., Conforti P., Volonté M.G. (2007). Mitochondrial role in ischemia-reperfusion of rat hearts exposed to high-K<sup>+</sup> cardioplegia and clonazepam: energetic and contractile consequences. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 85, 483-496.
- Cooper L.L., Li W., Lu Y., Centracchio J., Terentyeva R., Koren G and Terentyev D. (2013) Redox modification of ryanodine receptors by mitochondria-derived reactive oxygen species contributes to aberrant Ca<sup>2+</sup> handling in ageing rabbit hearts. *J. Physiol.* 591, 5895-5911.
- Costa A.D., Garlid K.D., West I.C., Lincoln T.M., Downey J.M., Cohen M.V., Critz S.D. (2005). Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. *Circ. Res.* 97, 329-336.

- Costa A.D.T., Quinlan C.L., Andrukhiv A., West I.C., Jaburek M., Garlid K.D. (2006). The direct physiological effects of mitoKATP opening on heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 209, H406-H415.
- Council National Research. (1989). *Lost crops of the Incas: Little known plants of the Andes with promise for Worldwide cultivation.* Washington DC: The National Academies Press, 57-65.
- Coward L., Kirk M., Albin N., Barnes S. (1996). Analysis of plasma isoflavones by reversed-phase HPLC-multiple reaction ion monitoring-mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta.* 247, 121-142.
- Cox D.A., Matlib M.A. (1993a). A role for the mitochondria  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  - exchanger in the regulation of oxidative phosphorylation in isolated heart mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry.* 268, 938-947.
- Cox D.A., Matlib M.A. (1993b). Modulation of intramitochondrial free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by antagonists of  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  exchange. *Trends in Pharmacological Sciences (TIPS).* 14, 408-413.
- Crompton M. (1990). The role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the function and dysfunction of heart mitochondria. *The Calcium and the heart.* Editado por G.A. Langer. Raven Press Ltd. New York. 167-198.
- Crompton M. (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 342, 233-249.
- Curtin N.A., Woledge R.A. (1978). Energy changes and muscular contraction. *Physiol. Rev.* 58, 690-761.
- D'Arrigo G., Benavides V., Pino J. (2004). Evaluación preliminar del efecto de *Lepidium meyenii* Walp en el desarrollo embrionario de ratón. *Rev. Per. Biol.* 11(1), 103-106.
- Demareux N., Distelhorst C. (2003). Cell biology. Apoptosis--the calcium connection. *Science.* 300(5616), 65-67.
- Deschamps A.M., Murphy E., Sun J. (2010). Estrogen receptor activation and cardioprotection in ischemia reperfusion injury. *Trends. Cardiovasc. Med.* 20(3), 73-78.
- Dhein S. (2005). The Langendorff Heart. In: *Practical Methods in Cardiovascular Research.* Dhein S., Mohr F. W., Delmar M. (eds). Springer, Heidelberg Berlin. Germany. 155-172.
- Di Lisa F., Bernardi P. (2006). Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: Fixing a hole. *Cardiovascular Research.* 70, 191-199.
- Di Lisa F., Bernardi P. (2009). A CaPful of mechanism regulating the mitochondrial permeability transition. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 775-780.
- Dini A., Migliuolo G., Rastrelli L., Saturnino P., Schettino O. (1994). Chemical composition of maca. *Food Chemistry* (49), 347-349.

- Dini I., Terone G., Dini A. (2002). Glucosinolates from maca (*Lepidium meyenii*). *Biochemical Systematics and Ecology*. 97, 1087-1090.
- Donoso P., Mill J.G., O'Neill S.C., Eisner D.A. (1992). Fluorescence measurements of cytoplasmic and mitochondrial sodium concentration in rat ventricular myocytes. *The Journal of physiology*. 448, 493-509.
- Dording C.M., Fisher L., Papakostas G., Farabaugh A., Sonawalla S., Fava M., et al. (2008). A double blind, randomized, pilot dose-finding study of maca root (*L. meyenii*) for the management of SSRI induced sexual dysfunction. *CNS Neurosci. Ther.* 14(3), 182-191.
- Dos Santos P., Kowaltowski A.J., Laclau M.N., Seetharaman S., Paucek P., Boudina S., Thambo J.B., Tariosse L., Garlid K.D. (2002). Mechanisms by which opening the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel protects the ischemic heart. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 283, H284-H295.
- Dupont W.D., Plummer W.D. (1990). Power and sample size calculations. *Control Clin. Trials*. 11(2), 116-128.
- Durand Goyzueta M.A. (2017). Transmisión y valoración de los conocimientos tradicionales de la "maca" *Lepidium meyenii* walp. (Brassicaceae) en los andes centrales del Perú y su distribución potencial. Lima: Universidad Mayor de San Marcos- Facultad de Ciencias Biológicas. E.A.P: de Ciencias Biológicas.
- Duranski M.R., Greer J.J., Dejam A., Jaganmohan S., Hogg N., Langston W., Patel R.P., Yet S.F., Wang X., Kevil C.G., Gladwin M.T., Lefer D.J. (2005). Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia reperfusion of the heart and liver. *J. Clin. Invest.* 115, 1232-1240.
- Fahey J., Zaleman A., Talalay P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*. 56, 5-51.
- Farmakalidis E., Murphy P.A. (1985). Isolation of 6''-O-acetylaidzein and 6''-O-acetylgenistein from toasted defatted soy flakes. *J. Agric. Food Chem.* 33, 385-389.
- Fernandez-Sanz C., Ruiz-Meana M., Miro-Casas E., Nuñez E., Castellano J., Loureiro M., Barba I., Poncelas M., Rodriguez-Sinovas A., Vázquez J., Garcia-Dorado D. (2014). Defective sarcoplasmic reticulum-mitochondria calcium exchange in aged mouse myocardium. *Cell. Death Dis.* 5, e1573.
- Fontaine E., Eriksson O., Ichas F., Bernardi P. (1998). Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex i. *J. Biol. Chem.* 273, 12662-12668.
- Fukumoto T., Tawa M., Yamashita N., Ohkita M., Matsumura Y. (2013). Protective effects of 17 beta-estradiol on post-ischemic cardiac dysfunction and norepinephrine overflow through the non-genomic estrogen receptor/nitric oxide-mediated pathway in the rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* 699(1-3), 74-80.

- Ganzera M., Zhao J., Muhammad I., Khan, I.A. (2002). Chemical Profiling and Standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. Chem. Pharm. Bull. 50 (7), 988-991.
- Garlid K.D. (2000) Opening mitochondrial KATP in the heart – what happens, and what does not happen. Basic. Res. Cardiol. 95, 275-279.
- Garlid K.D., Costa A.D.T., Quinlan C.L., Pierre S.V., Dos Santos P. (2009) Cardioprotective signaling to mitochondria. J. Mol. Cell. Cardiol. 46, 858-866.
- Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V., Murray H.N., Darbenzio R.B., D'Alonzo A.J., Lodge N.J., Smith M.A., Grover G.J. (1997). Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. Circ. Res. 81, 1072–1082.
- Garlid K.D., Paucek P., Yarov-Yarovoy V., Sun X., Schindler P.A. (1996). The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. J. Biol. Chem. 271, 8796–8799.
- Garvin A.M., Aurigemma N.C., Hackenberger J.L., Korzick D.H. (2017). Age and ischemia differentially impact mitochondrial ultrastructure and function in a novel model of age-associated estrogen deficiency in the female rat heart. Pflugers Arch. 469, 1591-1602.
- Gasco M., Aguilar J., Gonzales G.F. (2007). Effect of chronic treatment with three varieties of *Lepidium meyenii* (Maca) on reproductive parameters and DNA quantification in adult male rats. Andrologia. 39(4), 151-158.
- Gasco M., Villegas L., Villegas L., Rubio J., Gonzales G.F. (2007). Dose-response effect of Red Maca (*Lepidium meyenii*) on benign prostatic hyperplasia induced by testosterone enanthate. Phytomedicine. 14(7-8), 460-464.
- Gasco M., Yucra S., Rubio J., Gonzales G.F. (2008). *Lepidium meyenii* (Maca) varieties did not alter female reproductive parameters in adult male rats. J. Complem. Integr. Med. 5(1).
- Gibbs C.L., Chapman J.B. (1979). Cardiac heat production. Annu. Rev. Physiol. 41, 507-519.
- Gibbs C.L, Loisel D.L., Wendt I.R. (1988). J. Physiol. 395, 115-130.
- Gonzales C., Cárdenas-Valencia I., Leiva-Revilla J., Anza-Ramirez C., Rubio J., Gonzales G.F. (2010). Effects of different varieties of Maca (*Lepidium meyenii*) on bone structure in ovariectomized rats. Forsch Komplementmed. 17(3):137-143.
- Gonzales G.F. (2006). Maca de la Tradición a la Ciencia. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- Gonzales, G.F. (2010). Maca: del alimento perdido de los Incas al milagro de los Andes. Estudio de seguridad Alimentaria y Nutricional. Segurança Alimentar e Nutricional, 17 (1), 16-36.

- Gonzales G.F., Córdova A., Gonzales C., Chung A., Vega K., Villena A. (2001) *Lepidium meyenii* (Maca) improved semen parameters in adult men. *Asian J. Androl.* 3(4), 301-303.
- Gonzales G.F., Córdova A., Vega K., Chung A., Villena A. (2003). Effect of *Lepidium meyenii* (maca), a root with aphrodisiac and fertility-enhancing properties, on serum reproductive hormone levels in adult healthy men. *J. Endocrinol.* 176, 163-168.
- Gonzales G.F., Córdova A., Vega K., Chung A., Villena A., Góñez C., *et al.* (2002). Effect of *Lepidium meyenii* (MACA) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. *Andrologia.* 34(6), 367-372.
- Gonzales G.F., Gasco M., Lozada-Requena I. (2013). Role of maca (*Lepidium meyenii*) consumption on serum interleukin-6 levels and health status in populations living in the Peruvian Central Andes over 4000 m of altitude. *Plant Foods Hum. Nutr.* 68(4), 347-351.
- Gonzales G.F., Gonzales-Castañeda C., Gasco M. (2013). A mixture of extracts from Peruvian plants (black maca and yacon) improves sperm count and reduced glycemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Toxicol. Mech. Methods.* 23(7), 509-518.
- Gonzales G.F., Miranda S., Nieto J., Fernandez G., Yucra S., Rubio J., *et al.* (2005) Red Maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3(1):5.
- Gonzales G.F., Rubio J., Chung A., Gasco M., Villegas L. (2003). Effect of alcoholic extract of *Lepidium meyenii* (Maca) on testicular function in male rats. *Asian J. Androl.* 5(4), 349-352.
- Gonzales G.F., Ruiz A., Gonzales C., Villegas L., Cordova A. (2001). Effect of *Lepidium meyenii* (maca) roots on spermatogenesis of male rats. *Asian J. Androl.* 3(3), 231-233.
- Gonzales G.F., Villaorduña L., Gasco M., Rubio J., Gonzales C. (2014). Maca (*Lepidium meyenii* Walp), a review of its biological properties. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica.* 31(1), 100-110.
- Griffiths E. (2009). Mitochondrial calcium transport in the heart: Physiological and pathological roles. *J. Mol Cell. Cardiol.* 46, 789-803.
- Griffiths E.J., Ocampo C.J., Savage J.S., Rutter G.A., Hansford R.G., Stern M.D., Silverman H.S. (1998). Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research.* 39, 423-433.
- Gunter T.E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R., Gunter K. (2000). Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell. Calcium.* 28, 285-296.
- Gutierrez Parvina J.E., Montano Fuentes K., Bracho Perez J.C., Rodriguez Best C., Chang Canales A. (2009). Caracterización de esteroides en la fracción lipídica de la



- maca (*Lepidium meyenii* Walp.) mediante técnicas cromatográficas. Rev. Soc. Quim. Peru. 75 (2), 254-265.
- Halestrap A.P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore?. J. Mol. Cell. Cardiol. 46, 821-831.
  - Halestrap A.P., Brenner C. (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. Curr. Med. Chem. 10, 1507-1525.
  - Halestrap A.P., Clarke S.J., Javadov S.A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. Cardiovasc. Res. 61, 372-85.
  - Halestrap A.P., Clarke S. J., Khaliulin I. (2007). The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. Biochim. Biophys. Acta. 1767, 1007-1031.
  - Hamilton S., Terentyev D. (2019). Altered intracellular calcium homeostasis and arrhythmogenesis in the aged heart. Int. J. Mol. Sci. 20, 2386-2408.
  - Hanley P.J., Gopalan K.V., Lareau R.A., Srivastava D.K., von Meltzer M., Daut J. (2003). Beta-oxidation of 5-hydroxydecanoate, a putative blocker of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. J. Physiol. 547, 387-393.
  - Hanley P.J., Mickel M., Löffler M, Brandt U., Daut J. (2002). KATP channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. J. Physiol. 542(3), 735-741.
  - Harris H.A. (2007). Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. Mol. Endocrinol. 21(1), 1-13.
  - Hermann M., Bernet T. (2009). The transition of maca from neglect to market prominence: Lessons for improving use strategies and market chains of minor crops. Agricultural Biodiversity and Livelihoods Discussion Papers, 23-37.
  - Hodis H.N., Mack W.J., Kono N., et al. (2011). Isoflavone soy protein supplementation and atherosclerosis progression in healthy postmenopausal women. Stroke. 42(11), 3168-3175.
  - Huang Z., Shiva S., Kim-Shapiro D.B., Patel R.P., Ringwood L.A., Irby C.E., Huang K.T., Ho C., Hogg N., Schechter A.N., Gladwin M.T. (2005). Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. J. Clin. Invest. 115, 2099-2107.
  - Imahashi K., Pott C., Goldhaber J.I., Steenbergen C., Philipson K.D., Murphy E. (2005). Cardiac-specific ablation of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger confers protection against ischemia/reperfusion injury. Circ. Res. 97, 916-921.
  - Inagaki K., Chen L., Ikeno F., Lee F.H., Imahashi K., Bouley D.M., Rezaee M., Yock P.G., Murphy E., Mochly-Rosen D. (2003). Inhibition of delta-protein kinase C

- protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo. *Circulation*. 108, 2304–2307.
- Ishida H., Hirota Y., Genka C., Nakazawa H., Nakaya H., Sato T. (2001). Opening of mitochondrial KATP Channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circulation Research*. 89, 856-858.
  - Iwai T., Tanonaka K., Koshimizu M., Takeo S. (2000). Preservation of mitochondrial function by diazoxide during sustained ischaemia in the rat heart. *Br. J. Pharmacol.* 129, 1219-1227.
  - Jones S.P., Bolli R. (2006). The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 40, 16–23.
  - Kargozar R., Azizi H., Salari R. (2017). A review of effective herbal medicines in controlling menopausal symptoms. *Electronic Physician*. 9(11), 5826-5833.
  - Kelly G.E., Joannou G.E., Nelson C., Reeder A.Y., Waring M.A. (1993). Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin. Chim. Acta.* 223, 9–22.
  - Kiriazis H., Gibbs C. L. (2000). Effects of aging on the work output and efficiency of rat papillary muscle. *Cardiovasc. Res.* 48, 111-119.
  - Korzick D.H., Lancaster T.S. (2013). Age-related differences in cardiac ischemia-reperfusion injury: effects of estrogen deficiency. *Pflugers Arch.* 465, 669-685.
  - Kowaltowski A.J., Seetharaman S., Paucek P., Garlid K.D. (2001) Bioenergetic consequences of opening the ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel of heart mitochondria. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280: H649-H657.
  - Kurzer M.S., Lampe J.W., Martini MC, Adlercreutz H. (1996). Fecal lignan and isoflavonoid excretion in premenopausal women consuming flaxseed powder. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 4, 353–358.
  - Lee K.J., Dabrowski K., Rinchard J., Gomez C., Guz L., Vilchez C. (2004). Supplementation of maca (*Lepidium meyenii*) tuber meal in diets improves growth rate and survival of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) alevins and juveniles. *Aquaculture Res.* 35(3), 215-223.
  - Lee K.J., Dabrowski K., Sandoval M., Miller M.J.S. (2005). Activity-guided fractionation of phytochemicals of maca meal, their antioxidant activities and effects on growth, feed utilization and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture*. 244, 293-301.
  - Lee M.S., Shin B.C., Yang E.J., Lim H.J., Ernst E. (2011). Maca (*Lepidium meyenii*) for treatment of menopausal symptoms: A systematic review. *Maturitas.* 70, 227-233.
  - León, J. (1964). The "Maca" (*Lepidium meyenii*), A Little Known Food Plant Of Peru. *Economy Botany.* 18, 122-127.
  - León-Velarde F. (2005). Consensus Statement on Chronic and Subacute High Altitude Diseases. *High Altitude Medicine & Biology.* 147-157.

- Li H., Samouilov A., Liu X., Zweier J.L. (2001). Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. *J. Biol. Chem.* 276, 24482–24489.
- Li H., Zhang Y., Tian Z., Qiu X., Gu J., Wu, J. (2008). Genistein stimulates myocardial contractility in guinea pigs by different subcellular mechanisms. *European Journal of Pharmacology.* 597, 70-74.
- Liew R., Stagg M.A., Chan J., Collins P., MacLeod K.T. (2004). Gender determines the acute actions of genistein on intracellular calcium regulation in the guinea-pig heart. *Cardiovasc. Res.* 61, 66-76.
- Lindsay D.R., Kelly R.W. (1970). The metabolism of phytoestrogen in sheep. *Aust. Vet. J.* 46, 219–222.
- Liu Y., Gao W.D., O'Rourke B., Marban E. (1996). Synergistic modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> currents by protein kinase C and adenosine. Implications for ischemic preconditioning. *Circ. Res.* 78, 443–454.
- Liu T., O'Rourke B. (2008). Enhancing mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. *Circ. Res.* 103, 279-288.
- Liu T., Takimoto E., Dimaano V.L., et al. (2014). Inhibiting mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange prevents sudden death in a guinea pig model of heart failure. *Circ. Res.* 115, 44-54.
- Lu K., Otani H., Yamamura T., Nakao Y., Hattori R., Ninomiya H., Osako M., Imamura H. (2001). Protein kinase C isoform-dependent myocardial protection by ischemic preconditioning and potassium cardioplegia. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 121(1), 137-148.
- Macin S.M. y col. (2009). *Revista de la Federación Argentina de Cardiología* 38 (Supl. 1), S3-S23.
- Martínez- Martínez, A. (septiembre de 2005). Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquía. Recuperado el 06 de 12 de 2018, de Yumpu: <https://www.yumpu.com/s/MWgKbzmreunZVUWy>
- Matos Mendieta, R. (1980). La agricultura prehispánica en las punas de Junín. *Allpanchis* (14), 91-108.
- Mattiazzi A., Argenziano M., Aguilar-Sanchez Y., Mazzocchi G., Escobar A.L. (2015) Ca<sup>2+</sup> Sparks and Ca<sup>2+</sup> waves are the subcellular events underlying Ca<sup>2+</sup> overload during ischemia and reperfusion in perfused intact hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 79, 69-78.
- Meissner H.O., Mrozikiewicz P., Bobkiewicz-Kozłowska T., Mscisz A., Kedzia B., Lowicka A., et al. (2006). Hormone-Balancing Effect of Pre-Gelatinized Organic Maca (*Lepidium peruvianum* Chacon): (I) Biochemical and Pharmacodynamic Study on Maca using Clinical Laboratory Model on Ovariectomized Rats. *Int. J. Biomed. Sci.* 2(3), 260-272.

- Meissner H.O., Mscisz A., Reich-Bilinska H., Kapczynski W., Mrozikiewicz P., Bobkiewicz-Kozłowska T., et al. (2006). Hormone-Balancing Effect of Pre-Gelatinized Organic Maca (*Lepidium peruvianum* Chacon): (II) Physiological and Symptomatic Responses of Early-Postmenopausal Women to Standardized doses of Maca in Double Blind, Randomized, Placebo-Controlled, Multi-Centre Clinical Study. *Int. J. Biomed. Sci.* 2(4), 360-374.
- Meissner H.O., Reich-Bilinska H., Mscisz A., Kedzia B. (2006). Therapeutic Effects of Pre-Gelatinized Maca (*Lepidium Peruvianum* Chacon) used as a Non-Hormonal Alternative to HRT in Perimenopausal Women - Clinical Pilot Study. *Int. J. Biomed. Sci.* 2(2), 143-159.
- Miller V.M., Garovic V.D., Kantarci K., Barnes J.N., Jayachandran M., Mielke M.M., Joyner M.J., Shuster L.T., Rocca W. A. (2013). Sex specific risk of cardiovascular disease and cognitive decline: pregnancy and menopause. *Biol. Sex. Differ.* 4, 6.
- Miller L.R., Marks C., Becker J.B., Hurn P.D., Chen W.J., Woodruff T., McCarthy M.M., Sohrabji F., Schiebinger L., Wetherington C.L., Makris S., Arnold A.P., Einstein G., Miller V.M., Sandberg K., Maier S., Cornelison T.L., Clayton J.A. (2017). Considering sex as a biological variable in preclinical research. *FASEB J.* 31, 29–34.
- MINCETUR. (2016). Maca. Perfil de producto. Plan de Desarrollo de Mercado de Canadá. Ministerio de Comercio Exterior y Turismo de Perú.
- Misra M.K., Sarwat M., Bhakuni P., Tuteja R., Tuteja N. (2009). Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med. Sci. Monit.* 15, RA209-219.
- Monteiro N.E.S., Queirós L.D., Lopes D.B., Pedro A.O., Macedo G.A. (2017). Impact of microbiota on the use and effects of isoflavones in the relief of climacteric symptoms in menopausal women – A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 6.
- Mosca S.M., Schinella G.R., Tournier H.A., Cingolani H.E. (2001). Is the protection against ischemia induced by red wine linked to its antioxidant capacity?. *Exp. Clin. Cardiol.* 6, 183-187.
- Muhammad, I., Zhao, J., Chuck Dunbar, D., & Khan, I. A. (2002). Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca'. *Phytochemistry*, 59, 105–110.
- Murata M., Akao M., O'Rourke B., Marban E. (2001). Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: posible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.* 89, 891–898.
- Murphy E., Perlman M., London R.E., Steenbergen C. (1991) Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ. Res.* 68, 1250–1258.
- Murphy, E., Steenbergen, C. (2008). Mechanisms Underlying Acute Protection from Cardiac. *Physiol Rev.* 88(2), 581–609.
- Obregon, L. (1999). Maca planta medicinal y nutritiva del Perú. *Natura medicatrix* (55), 26-27.

- Ojeda D., Jiménez-Ferrer E., Zamilpa A., Herrera-Arellano A., Tortoriello J., Alvarez L. (2010). Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Ethnopharmacology*. 127, 7–10.
- Oré R., Mayorca J.R., Valdivieso R., Ronceros G., Ráez E., Durand J., et al. (2004). Efectos adversos de la maca y atorvastatina en hígado de ratas hipercolesterolémicas. *Rev. Soc. Quim. Peru*, 70(1), 9- 17.
- O'Rourke B. (2004). Evidence for mitochondrial K<sup>+</sup> channels and their role in cardioprotection. *Circ. Res.* 94, 420–432.
- O'Rourke B., Blatter L.A. (2009). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake: tortoise or hare? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 767-774.
- Oshima M., Gu Y., Tsukada S. (2003). Effects of *Lepidium meyenii* Walp and *Jatropha macrantha* on blood levels of estradiol-17 $\beta$ , progesterone, testosterone and the rate of embryo implantation in mice. *J. Vet. Med. Sci.* 65(10), 1145-1146.
- Pain T., Yang X.M., Critz S.D., Yue Y., Nakano A., Liu G.S., Heusch G., Cohen M.V., Downey J.M. (2000). Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ. Res.* 87, 460–466.
- Pearsall, D. (1989). Adaptation of prehistoric hunter-Gatherers to the high Andes: the changing role of plant resources. Unwing Hyman In foraging to farming the evolution of plant exploitation. London: D. Harris and G. Hillman.
- Pellicer I., Rojas J., Vivas-Elias P. (2013). La observación participante y la deriva: dos técnicas móviles para el análisis de la ciudad contemporánea. El caso de Barcelona. *EURE*, 119-139.
- Ping P., Zhang J., Cao X., Li R.C., Kong D., Tang X.L., Qiu Y., Manchikalapudi S., Auchampach J.A., Black R.G., Bolli R. (1999). PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemiareperfusion in conscious rabbits. *Am. J. Physiol.* 276, H1468–H1481.
- Pino-Figueroa A., Nguyen D., Maher T.J. (2010). Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca). *Ann. NY Acad. Sci.* 1199, 77-85.
- Poder Ejecutivo Nacional. (1 de Diciembre de 2017). DI-2017-12281-APN-ANMAT#MS. Expediente N° 1-47-1110-970-17-2. Buenos Aires, Argentina.
- Ponce-Hornos J.E., Bonazzola P., Marengo F.D., Consolini A.E., Márquez M.T. (1995). Tension-dependent and tension-independent energy components of heart contraction. *Pflugers. Arch. Eur. J. Physiol.* 429, 841-851.
- Ponce-Hornos J.E., Ricchiuti N.V., Langer, G.A. (1982). Online calorimetry in arterially perfused rabbit interventricular septum. *Am. J. Physiol.* 243, H289-H295.
- Portillo, Z. (04 de Julio de 2014). Perú denuncia a China por biopiratería de maca. Recuperado el 04 de Febrero de 2020, de SciDev.net: <https://www.scidev.net/america-latina/agropecuaria/noticias/per-denuncia-a>

china-por-biopirateria-de-

maca.html?\_\_cf\_chl\_jschl\_tk\_\_=86600b413e57db803ff563e73f6fc88286fe95f0-1580836002-0-

ASy1fzMMFiojjRh3WYj01cHBiBKEDA6ioYqq88y9vkOVtTsBklUSEicKfQ1BPQOB3Ybe

- Prego I., Maldonado S., Otegui M. (1998). Seed Structure and Localization of Reserves in *Chenopodium quinoa*. *Ann. Bot.* 82, 481 - 488.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- Ragone M.I., Bayley M, Bonazzola P., Colareda G.A., Consolini A.E. (2020). Cardioprotective mechanisms of hypothyroidism on ischemia/reperfusion in rats and effects of carvedilol: energetic study" *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 25(1), 72-85.
- Ragone M.I., Bonazzola P., Colareda G.A., Consolini A.E. (2015). Cardioprotective effect of hyperthyroidism on the stunned rat heart during ischaemia-reperfusion: energetics and role of mitochondria. *Exp. Physiol.* 100, 680-697.
- Ragone M.I., Consolini A.E. (2009). CARDIAC role of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transporters in the high-[K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> cardioprotection of rat hearts under ischemia and reperfusion: a mechano-energetic study. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 54 (3), 213-222.
- Ragone M.I., Torres N.S., Consolini A.E. (2013). Energetic study of cardioplegic hearts under ischaemia/reperfusion and [Ca<sup>2+</sup>] changes in cardiomyocytes of guinea-pig: mitochondrial role. *Acta Physiol. (Oxf)*. 207, 369-384.
- Ranilla L.G., Kwon Y.I., Apostolidis E., Shetty K. (2010) 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. *Bioresour. Technol.* 101(12), 4676-4689.
- Razavi H.M., Hamilton J.A., Feng Q. (2005). Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure. *Pharmacol. Ther.* 106(2), 147-162.
- Rea J. (1992). Cultivos marginados, otra perspectiva de 1492. (J. L. JE Hernandez-Bermejo, Ed.) Roma: Raíces Andinas en FAORome.
- Rick J., Moore, K. (1999). El precerámico de la Punas de Junín: El punto de vista de Panaulauca. *Boletín de Arqueología PUCP* (3), 263-296.
- Rodrigo M.E., Valdivieso R., Suárez S. (2011). Disminución del daño oxidativo y efecto hipoglicemiante de la maca (*Lepidium meyenii* Walp) en ratas con diabetes inducida por streptozotocina. *An. Fac. Med.*, 72(1), 7-11.
- Ronceros G., Ramos W., Garmendia F., Arroyo J., Gutiérrez J. (2005) Eficacia de la maca fresca (*Lepidium meyenii* WALP) en el incremento del rendimiento físico de deportistas en altura. *An. Fac. Med.* 66(4), 269-273.

- Rubio J., Dang H., Gong M., Liu X., Chen S-L., Gonzales G.F. (2007). Aqueous and hydroalcoholic extracts of Black Maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice. *Food Chem. Toxicol.* 45(10), 1882-1890.
- Ruiz-Luna A.C., Salazar S., Aspajo N.J., Rubio J., Gasco M., Gonzales G.F. (2005). *Lepidium meyenii* (Maca) increases litter size in normal adult female mice. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3(1), 16.
- Ruiz-Meana M., Minguet M., Bou-Teen D., Miro-Casas E., Castans C., Castellano J., Bonzon-Kulichenko E., Igual A., Rodriguez-Lecoq R., Vazquez J., Garcia-Dorado D. (2019) Ryanodine Receptor Glycation Favors Mitochondrial Damage in the Senescent Heart. *Circulation*, 139(7), 949-964.
- Salas M.A., Valverde C.A., Sánchez G., Said M., Rodriguez J.S., Portiansky E.L., Kaetzel M.A., Dedman J.R., Donoso P., Kranias E.G., Mattiazzi A. (2010). The signalling pathway of CAMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48(6), 1298–1306.
- Sánchez-Calvo J.M., Rodríguez-Iglesias M.A., Molinillo J.M.G., Macías F.A. (2013). Soy isoflavones and their relationship with microflora: beneficial effects of human health in equol producers. *Phytochemistry Reviews.* 12 (4), 970- 1000.
- Sasaki N., Sato T., Ohler A., O'Rourke B., Marban E. (2000). Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels by nitric oxide. *Circulation.* 101, 439–445.
- Saurin A.T., Pennington D.J., Raat N.J.H., Latchman D.S., Owen M.J., Marber M.S. (2002). Targeted disruption of the protein kinase C epsilon gene abolishes the infarct size reduction that follows ischaemic preconditioning of isolated buffer-perfused mouse hearts. *Cardiovasc. Res.* 55, 672–680.
- Schafer C., Ladilov Y., Inserte J., Schafer M., Haffner S., García-Dorado D., Piper H.M. (2001). Role of the reverse mode of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc. Res.* 51, 241–250.
- Schinella G., Fantinelli J.C., Mosca S.M. (2005). Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. *Clinical Nutrition.* 24, 360-366.
- Sekikawa A., Ihara M., Lopez O., Kakuta C., Lopresti B., Higashiyama A., Aizenstein H., Chang Y., Mathis Ch., Miyamoto Y., Kuller L., Cui Ch. (2019). Effect of S-equol and Soy Isoflavones on Heart and Brain. *Current Cardiol. Rev.* 15, 114-135.
- Setchell K.D. (1998). Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* 68(suppl), 1333S–1346S.
- Setchell K.D., Borriello S.P., Hulme P., Kirk D.N., Axelson M. (1984). Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormonedependent disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 40, 569–578.

- Setchell K.D., Clerici C. (2010). Equol: history, chemistry, and formation. *J. Nutr.* 140, 1355S-1362S.
- Setchell K.D., Clerici C., Lephart E.D., Cole S.J., Heenan C., Castellani D., Wolfe B.E., Nechemias-Zimmer L., Brown N.M., Lund T.D., Handa R.J., Heubi J.E. (2005). S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am. J. Clin. Nutr.* 81(5), 1072-1079.
- Sfakianos J., Coward L., Kirk M., Barnes S. (1997). Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in the rat. *J. Nutr.* 127, 1260-1268.
- Shao Q. et al. (2016). Characterization of the sex-dependent myocardial S-nitrosothiol proteome. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310, H505-H515.
- Shiva S., Huang Z., Grubina R., Sun J., Ringwood L.A., MacArthur P.H., Xu X., Murphy E., Darley-Usmar V.M., Gladwin M.T. (2007). Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ. Res.* 100, 654-661.
- Sifuentes-Penagos G., León-Vásquez S., Paucar- Menacho L. M. (2015). Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), cultivo andino con propiedades terapéuticas. *Scientia Agropecuaria.* 6 (2), 131-140.
- Simkovich B.Z., Przyklenk K., Kloner R.A. (1998). Role of protein kinase C as a cellular mediator of ischemic preconditioning: a critical review. *Cardiovasc. Res.* 40, 9-22.
- Stone M., Ibarra A., Roller M., Zangara A., Stevenson E. (2009). A pilot investigation into the effect of maca supplementation on physical activity and sexual desire in sportsmen. *J. Ethnopharmacol.* 126(3), 574-576.
- Suetsugi M., Su L., Karlsberg K., Yuan Y-C, Chen S. (2003). Flavone and isoflavone phytoestrogens are agonists of estrogen-related receptors. *Mol Cancer Res.* 1(13), 981-991.
- Sun M.L., Nayoung K., Ji H.P., Ryoung H.N., Kichul Y., Dong H. (2018). Comparative Analysis of Ileal and Cecal Microbiota in Aged Rats. *JOURNAL OF CANCER PREVENTION.* 23, 70-76.
- Sun J., Picht E., Ginsburg K.S., Bers D.M., Steenbergen C., Murphy E. (2006). Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha1 subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circ. Res.* 98, 403-411.
- Takeuchi A., Kim B., Matsuoka S. (2013). The mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger, NCLX, regulates automaticity of HL-1 cardiomyocytes. *Sci. Rep.* 3, 2766.
- Tang Y., Li S., Zhang P., Zhu J., Meng G., Xie L., Yu Y., Ji Y, Han Y. (2016). Soy Isoflavone Protects Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury through Increasing Endothelial Nitric Oxide Synthase and Decreasing Oxidative Stress in



Ovariectomized Rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity Volume, Article ID 5057405, 14 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5057405>

- Testai L. (2015). Flavonoids and mitochondrial pharmacology: a new paradigm for cardioprotection. *Life Sci.* 135, 68-76.
- Tong H., Chen W., Steenbergen C., Murphy E. (2000). Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ. Res.* 87, 309–315.
- Tong H., Rockman H.A., Koch W.J., Steenbergen C., Murphy E. (2004). G protein-coupled receptor internalization signaling is required for cardioprotection in ischemic preconditioning. *Circ. Res.* 94, 1133–1141.
- Trópicos (Base de datos). Consultada 6 de agosto de 2019. [www.tropicos.org](http://www.tropicos.org).
- Valentová K., Buckiova D., Kren V., Peknicova J., Ulrichova J., Simanek V. (2006). The in vitro biological activity of *Lepidium meyenii* extracts. *Cell. Biol. Toxicol.* 22(2), 91-99.
- Valentová K., Stejskal D., Bartek J., Dvorácková S., Kren V., Ulrichová J., et al. (2008). Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: in vivo safety assessment. *Food Chem. Toxicol.* 46(3), 1006-1013.
- Valerio LG, Gonzales GF. (2005). Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis. *Toxicol. Rev.* 24(1), 11-35.
- Valverde C.A., Korniyev D., Ferreira M., Petrosky A.D., Mattiazzi A., Escobar A. L. (2010). Transient Ca<sup>2+</sup> depletion of the sarcoplasmic reticulum at the onset of reperfusion. *Cardiovascular Research* 85, 671–680.
- Vecera R., Orolin J., Skottová N., Kazdová L., Oliyarnik O., Ulrichová J., et al. (2007). The influence of maca (*Lepidium meyenii*) on antioxidant status, lipid and glucose metabolism in rat. *Plant Foods Hum. Nutr.* 62(2), 59-63.
- Voronina T.A., Belopol'skaya M.V., Kheyfets I.A., Dugina Y.L., Sergeeva S.A., Epshtein O.I. (2009). Effect of ultralow doses of antibodies to S-100 protein in animals with impaired cognitive function and disturbed emotional and neurological status under conditions of experimental Alzheimer disease. *Bull. Exp. Biol. Med.* 148(3), 533-535.
- Willems L., Zatta A., Holmgren K., Ashton K. J., Headrick J. P. (2005). Age-related changes in ischemic tolerance in male and female mouse hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 245-256.
- Xu W., Liu Y., Wang S., McDonald T., Van Eyk J.E., Sidor A., O'Rourke B. (2002). Cytoprotective role of Ca<sup>2+</sup>- activated K<sup>+</sup> channels in the cardiac inner mitochondrial membrane. *Science.* 298, 1029-1033.

- Yábar E., Chirinos R., Campos D. (2019). Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado natural post-cosecha. *Scientia Agropecuaria*, 10 (1), 85-97.
- Yábar E., Pedreschi R., Chirinos R., Campos, D. (2011). Glucosinolate content and myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and postharvest drying. *Food Chemistry*. 127, 1576-1583.
- Yeo S.K., Liong M.T. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 61(2), 161-181.
- Zenico T., Cicero A.F., Valmorri L., Mercuriali M., Bercovich E. (2009). Subjective effects of *Lepidium meyenii* (Maca) extract on well-being and sexual performances in patients with mild erectile dysfunction: a randomised, double-blind clinical trial. *Andrologia*. 41(2), 95-99.
- Zhang X., Gao Y.T., Yang G., et al. (2012). Urinary isoflavonoids and risk of coronary heart disease. *Int. J. Epidemiol.* 41(5), 1367-1375.
- Zhang Y., Yu L., Ao M., Jin W. (2006). Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. *J. Ethnopharmacol.* 105(1-2), 274-279.
- Zhang Y., Yu L., Jin W., Ao M. (2014). Effect of ethanolic extract of *Lepidium meyenii* Walp on serum hormone levels in ovariectomized rats. *Indian J. Pharmacol.* 46(4), 416-419.