

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Comparación de la actividad de extractos de *Lepidium peruvianum* Chacón (maca) sobre leucocitos procedentes de individuos saludables e infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)

TESIS

para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Biología Celular y Genética

AUTORA

Jacquelin Garcia Hurtado

Lima-Perú

2010

Esta tesis está dedicada al gran motor por el cual gira ahora mi vida, mi querida hija Sofía, también a dos personas muy importantes sin las cuales no habría llegado a ser lo que ahora soy, mis padres: Isabel e Hipólito

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Libertad Alzamora por la oportunidad y confianza que me dió para poder realizar la tesis en su laboratorio así como por consejos y sugerencias.

Al Profesor Cesar Córdova por su gran ayuda, confianza y paciencia en la redacción de la tesis, así como por brindarme su amistad sincera.

A mis padres por su gran dedicación, comprensión y apoyo interminables.

A mis hermanas por su ayuda constante, apoyo y consejos tanto en mi vida personal como profesional.

A Edwards por enseñarme a ver la vida de una manera diferente, por los consejos que me brinda, su lucha constante por salir adelante y el ímpetu con que toma las cosas.

A Nilda, Ursula, Dyana, Betty, Patty y Jimmy por acompañarme y brindarme su amistad en el tiempo que estuvimos en la universidad

A Madeley, Gianinna, Dina y Martín por su amistad y ayuda en la realización de la tesis.

A la Dra. María Díaz Vera por permitirme acceder a su institución (Hospital Rezola de Cañete) y darme todas las facilidades del caso.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
III. HÍPOTESIS Y OBJETIVOS	19
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	20
V. RESULTADOS	28
VI. DISCUSIÓN	46
VII. CONCLUSIONES	51
VIII. RECOMENDACIONES	52
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
X. ANEXOS	64

ABREVIATURAS

Abm	Anticuerpo monoclonal
RNA	Ácido ribonucleico
CD	Antígeno de diferenciación (Cluster of differentiation)
CN	Control negativo
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EC	Extracto clorofórmico
EAc	Extracto acuoso
EM	Extracto metanólico
Env	Envoltura del HIV
FICT	Isotiocianato de fluoresceína
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ONUSIDA	Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el HIV/SIDA
OMS	Organización Mundial de la Salud
PE	Ficoeritrina
PerCP	Piridin clorofil proteína
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo celular)
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

RESUMEN

La infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), causa una profunda inmunodepresión que expone a las personas infectadas a diversas infecciones oportunistas. *Lepidium peruvianum Ch.* presenta varias propiedades como, su capacidad estimulante de la reproducción y energizante, investigaciones recientes han demostrado su capacidad antitumoral e inmunoestimulante.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad de tres tipos de extractos (clorofórmico, acuoso y metanólico) de *L. peruvianum Ch.* en cultivos de leucocitos de personas saludables y HIV-1⁺. Para ello, células sanguíneas de 5 voluntarios sanos y 5 HIV-1⁺ fueron cultivadas por triplicado en presencia de cada extracto a una concentración final de 800µg/mL y se incubó por 16 horas a 37 °C. Se realizó el recuento de los leucocitos y sus 4 estirpes celulares (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos) mediante hemograma manual y de las poblaciones de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ por citometría de flujo. Se empleó el medio de cultivo RPMI como control negativo de la prueba.

En las personas saludables, para las 4 estirpes celulares evaluadas, el extracto clorofórmico logró incrementar significativamente el número de linfocitos ($p=0.003$). La población linfocitaria T CD3⁺CD4⁺ presentó un incremento celular con el extracto clorofórmico ($p= 0.004$). En las personas HIV-1⁺, los 3 extractos lograron incrementar el número de leucocitos. En los individuos pertenecientes al estadio C se observó que el extracto clorofórmico logró un incremento significativo del número de linfocitos respecto al control.

Estos resultados pueden ser de gran ayuda para utilizar a *L. peruvianum Ch.* en el tratamiento de personas infectadas con HIV-1 contribuyendo con restaurar el nivel y funcionamiento de las células T infectadas por el virus.

Palabras clave: *Lepidium peruvianum*, *Lepidium meyenii*, maca, inmunoestimulante, metabolitos secundarios, HIV-1, SIDA.

ABSTRACT

Infection with the human immunodeficiency virus (HIV), causes a profound immunosuppression that exposes people infected to various opportunistic infections. *Lepidium peruvianum* Ch. has several properties, the most known, its ability stimulating the reproduction and energizing or revitalizing, recent research has shown antitumor and immunostimulatory capacity.

The aim of this study was to determine the activity of three types of extracts (chloroform, methanol and aqueous) of *L. peruvianum* Ch. in cultures of leukocytes from healthy people and HIV-1⁺. To do this, blood cells from 5 healthy and 5 HIV-1⁺ volunteers were cultured in triplicate in the presence of each extract at a final concentration of 800µg/mL and incubated for 16 hours at 37 ° C. We performed the counting of leukocytes and their 4 cell lines (lymphocytes, neutrophils, eosinophils and monocytes) through a hemogram and populations of T lymphocytes CD3⁺ CD4⁺ and CD3⁺ CD8⁺ by flow cytometry. We employed RPMI culture medium as negative control test.

In healthy people, for the 4 cell lines tested, the chloroform extract was able to increase significantly the number of lymphocytes ($p= 0.003$). The CD3⁺CD4⁺ lymphocyte population showed an increase cell with the chloroform extract ($p= 0.004$). In people HIV-1⁺ the 3 extracts were able to increase the number of leukocytes. In individuals belonging to stage C showed that the chloroform extract achieved a significant increase in number of lymphocytes over control.

These results may be helpful to use a *L. peruvianum* Ch. in treating people infected with HIV-1 contributing to restore the level and function of T cells infected with the virus.

Keywords: *Lepidium peruvianum*, *Lepidium meyenii*, maca, immunostimulant, secondary metabolites, HIV-1, AIDS.

I. INTRODUCCIÓN

La infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) produce disturbios funcionales profundos en las células del sistema inmune durante el curso de la infección, debilitando la función inmunológica, de manera tal que las personas que la padecen son blancos de diversas infecciones oportunistas. El ONUSIDA (Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el HIV/SIDA) calculó que en el año 2007 ocurrieron 1 40 000 nuevas infecciones por HIV en América Latina, lo que representa aproximadamente 388 nuevos casos diarios.

Las plantas producen un gran número de moléculas, entre ellas, los metabolitos secundarios que son biosintetizados en las plantas para diferentes propósitos, incluyendo regulación del crecimiento, interacciones intra e interespecíficas, y defensa contra depredadores e infecciones; asimismo, estas sustancias tienen un potencial inmunoestimulante y antimicrobiano en los seres humanos. Dentro de estos metabolitos se incluyen flavonoides, indoles, fitoesteroles, polisacáridos, sesquiterpenos, alcaloides, glucanos, taninos, etc (Williams, 2001).

Los metabolitos secundarios producidos por las plantas son utilizados por el hombre para tratar una variedad de enfermedades. Aproximadamente el 25% de las drogas prescritas en el mundo entero provienen de plantas y se ha estimado que el 60% de las drogas anti-infecciosas y anti-tumorales son de origen natural (Kirszberg *et al.*, 2003). Muchos de estos metabolitos secundarios presentan actividades farmacológicas y biológicas interesantes y son usados como agentes quimioterapéuticos o sirven como punto inicial para el desarrollo de medicinas (Verpoorte, 1998 y 2000).

Muchos grupos de investigación están estudiando la diversidad vegetal para encontrar nuevos y mejores fármacos anti-HIV con nuevos mecanismos de acción. El

efecto y acción de los metabolitos secundarios como agentes antivirales específicamente contra el HIV han sido ampliamente investigado (Chen *et al.*, 2006; Cos *et al.*, 2004; Horiuch *et al.*, 2006; Takada *et al.*, 2007; y Yu *et al.*, 2007). Asimismo se ha encontrado que éstos tienen la capacidad de provocar el incremento del número de linfocitos T CD4 en personas inmunosuprimidas HIV-1⁺ (Bot *et al.*, 2007).

Lepidium peruvianum Ch. presenta varias propiedades, siendo la más conocida su capacidad estimulante de la reproducción (Chacón, 1961 y 1990), y energizante o revitalizadora (Quirós y Aliaga, 1997), pero también se ha demostrado su capacidad antitumoral (Alzamora, 2002) y trabajos realizados suministrándole extracto acuoso a ratones inmunosuprimidos han permitido demostrar su capacidad inmunoestimulante e inmunopotenciadora (Alzamora *et al.*, 2004). Recientemente se ha demostrado esta actividad en el extracto metanólico del ecotipo morado en cultivos de linfocitos T humanos (Alzamora *et al.*, 2007); en base a esta última propiedad, se podría utilizar esta planta para el tratamiento de las personas infectadas con el HIV a fin de restaurar el nivel y funcionamiento de su sistema inmune, que unido a su capacidad energizante y revitalizante la colocarían como un excelente agente para ser utilizado en una terapia alternativa o como adyuvante del tratamiento que actualmente reciben las personas HIV⁺.

II. MARCO TEÓRICO

1 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA

El género *Lepidium* incluye aproximadamente 175 especies, distribuidas en prácticamente todos los continentes, excepto la Antártida, siendo más amplio dentro de las *Brassicaceas*. Las especies de América del Norte, Australia y Europa han sido estudiadas extensamente, pero se sabe muy poco de las especies endémicas andinas (Quirós, 1999).

El término maca es utilizado por el Dr. Javier Pulgar Vidal como proveniente de dos voces de la lengua chibcha, MA que tiene significado de origen de la cultura (que ha sido cultivada o encontrada en la altura) y CA que significa alto, excelso, comida buena que fortalece.

La Maca es una planta herbácea, bienal. Presenta una roseta externa de hojas y un órgano subterráneo, reservante y succulento; formado por una parte de tejido del tallo (hipocótilo) y raíz pivotante verdadera con raicillas que es la parte comestible (Tello *et al.*, 1992).

Los cultivares de *L. peruvianum* Ch. que existen en la actualidad se diferencian por el color externo de la raíz-hipocótilo (al cual llamaremos en adelante solo como raíz), que es bastante variable, se han identificado seis colores básicos: crema, morado, rojo, blanco, plomo y negro, y dos combinaciones: morado-blanco y el morado crema (Ponce, 1995), denominándose a cada uno como ecotipos. Se entiende como ecotipo a un grupo dentro de una especie que presenta características distintas, resultado de su adaptación al medio local (Álvarez, 2008).

1.2 Clasificación Taxonómica

Lepidium peruvianum Chacón presenta la siguiente clasificación taxonómica (Cronquist, 1981):

DIVISIÓN: ANGIOSPERMAE

CLASE: DICOTYLEDONEAE

SUBCLASE: ARCHICHLAMYDEAE

ORDEN: PAPAVERALES

FAMILIA: BRASSICACEAE

GÉNERO: *Lepidium*

ESPECIE: *Lepidium peruvianum* Chacón

NOMBRES VULGARES: Maca, maca-maca, maka, maino, ayak chichira, ayak willku

1.3 Importancia Nutricional

La raíz de la maca tiene un alto valor nutritivo, semejante al de los cereales tales como maíz, arroz y trigo y superando ampliamente en contenido calórico, proteínas y carbohidratos a otras hortalizas (Dini *et al.*, 1994).

El análisis de los compuestos químicos derivados del carbono revela que la raíz de la maca contiene concentraciones cercanas al 60% de carbohidratos, 10% de proteínas, casi un 9% de fibra, y poco más de 2% de lípidos. Asimismo, las vitaminas B1, B2 (Chacón, 1997), C y E (Garró, 1999). El contenido proteico de la maca se manifiesta principalmente bajo la forma de cadenas polipeptídicas y aminoácidos, encontrándose presentes entre estos últimos la totalidad de los diez aminoácidos esenciales. Adicionalmente, aminoácidos tales como arginina, serina, histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, valina, fenilalanina, tirosina y treonina, se encuentran en cantidades altamente significativas (Cikutovic y Cikutovic, 2005).

El estudio llevado a cabo por Dini *et al.*, (1994) reveló que la maca es también un importante depósito de diversos ácidos grasos (linoleico, palmítico y oleico, entre otros), esteroides (stigmasterol, sitosterol y campesterol), saponinas, taninos y alcaloides, los cuales actúan como una importante fuente energética y estructural. Por otra parte, la composición mineral de la raíz de la maca, previamente desecada, reveló altas concentraciones de potasio, superando largamente a otros vegetales, también contiene calcio y hierro, cuya concentración supera en más del doble a la leche y lentejas, respectivamente. Por esta razón, ha sido usada tradicionalmente para el tratamiento de la osteoporosis (Cikutovic y Cikutovic, 2005)

2. METABOLITOS SECUNDARIOS EN *Lepidium peruvianum* Chacón

Las plantas producen un gran número de sustancias entre ellas los metabolitos secundarios (Williams, 2001) que son utilizadas por el hombre para tratar una variedad de enfermedades. Aproximadamente el 25% de las drogas prescritas en el mundo provienen de plantas y se ha estimado que el 60% de las drogas antiinfecciosas y antitumorales son de origen natural (Kirszberg *et al.*, 2003). Muchos de estos metabolitos secundarios han demostrado presentar actividades farmacológicas y biológicas interesantes y son usados como agentes quimioterapéuticos o sirven como punto inicial para el desarrollo de medicinas modernas (Verpoorte, 1998 y 2000).

Los metabolitos secundarios presentes en las plantas son elementos biológicos como flavonoides, polisacáridos, glucanos, ácidos polisaturados, alcaloides y otros componentes fisiológicamente activos. Varios de estos metabolitos secundarios han podido ser detectados en la raíz de *L. peruvianum* Ch. y algunos estudios sugieren que son los componentes responsables de sus efectos fisiológicos (Yllescas, 1994).

a) Alcaloides. Se clasifican como alcaloides a aquellas sustancias básicas con uno o más átomos de nitrógeno en su sistema cíclico, que manifiestan actividad farmacológica (Lock, 1994).

Los alcaloides forman una amplia y variada familia de metabolitos secundarios de moléculas no relacionadas entre sí, siendo de gran importancia económica debido a sus propiedades farmacológicas, las mismas que han sido usadas desde la prehistoria hasta la actualidad. Son los metabolitos mas frecuentes en el reino Plantae, habiéndose encontrado cerca de 10,000 alcaloides en aproximadamente 20 % de plantas con flores, principalmente dicotiledóneas herbáceas (Hopkins, 1999).

La mayoría de los alcaloides provienen del metabolismo de los aminoácidos, principalmente tirosina, triptófano, arginina y lisina, y aunque algunos alcaloides se encuentran en varios géneros o aún en una familia, la mayoría de las especies presentan un patrón único, genéticamente determinado. Por otro lado, su distribución está restringida a determinados órganos de la planta, como raíces, hojas o frutos jóvenes (Hopkins, 1999).

La primera vez que se identificaron alcaloides en maca, fue en los extractos etanólico, etílico y acetónico de las raíces, se detectaron cuatro alcaloides y se les denominaron macaina 1, 2, 3 y 4 (Chacón, 1961). Posteriormente también se ha detectado la presencia de alcaloides en las raíces de maca (Yllescas, 1994). Recientemente dos alcaloides imidazólicos han sido identificados: el cloruro de 1,3-dibenzil-4,5-dimetilimidazol llamado lepidilina A y el cloruro de 1,3-dibenzil-2,4,5-trimetilimidazol llamado lepidilina B (Valentová y Ulrichová, 2003).

b) Flavonoides. Son pigmentos naturales que se encuentran en vegetales, semillas, frutas y bebidas como vino y cerveza, poseen múltiples efectos positivos

principalmente debido a su acción antioxidante y eliminadora de radicales libres (Martínez *et al.*, 2002). A estos compuestos químicos fenólicos se les atribuyen propiedades diuréticas, hemostáticas, astringentes, antiinflamatorias y anticancerígenas (Martínez *et al.*, 2002).

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química (Olsson *et al.*, 1998).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que los flavonoides pueden modular la actividad de las enzimas que intervienen en el proceso de formación de las células cancerígenas (Krishnaswamy y Raghuramulu, 1998; Stavric, 1994). En experimentos *in vitro* se ha confirmado el papel protector de la quercitina, el flavonoide de mayor ingesta en la dieta humana la cual ejerce efectos de inhibición frente a células cancerígenas en humanos: en colon, glándula mamaria y ovario, en región gastrointestinal y en la leucemia.

Una posible explicación a estos efectos anticancerígenos podría derivarse del incremento que algunos flavonoides producen en las concentraciones intracelulares de glutatión (pequeña proteína que ayuda a mantener un equilibrio óptimo en la eliminación de radicales libres) a través de la regulación de la expresión de la enzima limitante en su síntesis (Hertog *et al.*, 1992).

Yllescas (1994) realizó un análisis fitoquímico de las raíces pulverizadas de tres ecotipos de maca (amarilla, roja y morada) e identificó tres fracciones de alcaloides y un flavonoide, la presencia de flavonoides en maca también se ha identificado por otros autores (Álvarez, 2008 y Torres, 2008). Rosas y Pino (2004) llevaron a cabo un estudio en extractos de *L. peruvianum* Ch., probando su efecto antioxidante mediante la inducción de hemólisis en eritrocitos *in vitro* y concluyeron

que los extractos acuoso y metanólico poseen mayor efecto antioxidante que el extracto clorofórmico.

La evaluación de la capacidad antioxidante de las hojas de *L. peruvianum* Ch. ha sido corroborada por los estudios realizados por Cuentas *et al.* (2008) en los que sugieren que podría estar relacionada con la presencia de flavonoides (quercetina) y de antocianinas, entre otros compuestos.

c) Saponinas. Las saponinas son compuestos preformados de tipo glicósidos, con una o más cadenas de azúcar y de alto peso molecular. Las saponinas han sido intensamente estudiadas en la búsqueda de nuevas alternativas de control de enfermedades (Apablaza *et al.*, 2002), son muy frecuentes en los vegetales (Bruneton, 2001) y tienen propiedades antimicótica, antibacteriana, antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena (Lin *et al.*, 1996). Las saponinas también tienen la propiedad de disminuir la proliferación celular de células tumorales e inducen apoptosis (Haridas *et al.*, 2001); otros derivados como los ginsenósidos de las hojas de *Panax ginseng* muestran propiedades antiinflamatorias (Shibata, 2001) e inhiben la invasión y metástasis de células tumorales (Zhu *et al.*, 1995) y el desarrollo del tumor (Kikuchi *et al.*, 1991). Las saponinas se han constituido desde hace bastante tiempo como precursores únicos de muchos medicamentos esteroideos tales como las hormonas sexuales, corticoides, contraceptivos orales y diuréticos (Hostettmann y Marston, 1995).

La presencia de saponinas en la maca pudo ser identificada por Yllescas (1994) junto con otros compuestos como cumarinas, taninos, glucósidos, aminoácidos libres y aminos secundarias alifáticas y aminos terciarias, y recientemente se ha observado en los estudios realizados por Ganzera *et al.* (2002).

3. SISTEMA INMUNE

En términos biológicos, inmunidad significa protección contra enfermedades, en especial, las infecciosas. Los vertebrados y entre ellos el hombre, han desarrollado mecanismos para protegerse de las agresiones que les vienen del ambiente, causadas por bacterias, virus, parásitos y toxinas, entre otros agentes, recibiendo el nombre de patógenos, o causantes de enfermedad (Abbas *et al.*, 2002).

Uno de estos mecanismos es la inmunidad denominada innata o inespecífica por que no depende de la exposición previa al patógeno. En los vertebrados puede activarse también una segunda línea de defensa, un sistema de reconocimiento específico del agente agresor (Abbas *et al.*, 2002). Estos procesos se denominan sistema inmune y está constituido por dos tipos de células:

(a) Las células accesorias, como son los macrófagos y las células dendríticas (así llamadas porque poseen ramificaciones), que participan en la captura y degradación (también denominada procesado) del antígeno, y

(b) las células inmunocompetentes o linfocitos, que pueden reconocer específicamente tanto al antígeno nativo como al procesado por las células accesorias.

Las células del sistema inmune se originan durante la hematopoyesis y todas derivan de las células hematopoyéticas troncales, también denominadas células indiferenciadas multipotentes porque pueden replicarse indefinidamente y diferenciarse en varias clases de células secundarias. (Goldsby *et al.*, 2004). Las células hematopoyéticas se diferencian en:

a) Precursores de la línea linfoide: Dan origen a los linfocitos B y T.

b) Precursores de línea mieloide: Dan origen a los granulocitos, macrófagos y mastocitos del sistema inmunológico. Los macrófagos son uno de los dos tipos de fagocitos del sistema inmunitario, y están ampliamente distribuidos por los tejidos corporales, son la forma madura de **los monocitos** que circulan por la sangre y se diferencian a macrófagos tras su migración dentro de los tejidos. Los mastocitos también se diferencian en los tejidos y residen cerca de los pequeños vasos sanguíneos, y cuando se activan liberan sustancias que afectan a la permeabilidad vascular. Los granulocitos, llamados también leucocitos polimorfonucleares, se diferencian en tres tipos celulares principales: **los neutrófilos**, que constituyen el otro tipo de células fagocíticas del sistema inmunitario y son el componente más numeroso e importante de la respuesta inmunitaria innata, **los eosinófilos** que son esencialmente importantes en la defensa frente a las infecciones por parásitos, y los basófilos de función similar y complementaria a la de los eosinófilos y mastocitos (Abbas *et al.*, 2002).

3.1 Linfocitos

Las respuestas inmunitarias específicas están mediadas por los linfocitos y son las únicas células en el organismo capaces de reconocer específicamente y distinguir diferentes determinantes antigénicos. Estos se producen en los órganos linfoides centrales o primarios (el timo y la médula ósea de los adultos) a alta velocidad (10^9 células cada día). Un ser humano adulto normal posee unas 10^{12} células linfoides, y el conjunto del tejido linfoide representa aproximadamente un 2 % del peso corporal total. Las células linfoides suelen constituir alrededor del 20 % de los leucocitos circulantes totales (Goldsby *et al.*, 2004).

Los linfocitos B, productores de anticuerpos, maduran en la médula ósea (o en un órgano equivalente de las aves, denominado Bursa de Fabricius, de donde proviene la denominación de linfocito B). Los linfocitos T lo hacen en el timo, donde se

diferencian en linfocitos T citotóxicos (Tc), que destruyen las células infectadas, y linfocitos T colaboradores (Th, por helper), que ayudan a los B y a los macrófagos a cumplir su función (Janeway *et al.*, 2003).

Los linfocitos, así como otros leucocitos, expresan un gran número de moléculas de superficie diferentes, algunas de ellas aparecen momentáneamente en etapas particulares de la diferenciación o de la activación celular; las cuales pueden utilizarse para distinguir (o marcar) las distintas poblaciones celulares. En la actualidad muchos de estos marcadores de membrana pueden ser detectados por anticuerpos monoclonales específicos. (Hannet, 1992 y Parnes, 1987) y forman parte del grupo denominado cluster o conjuntos de diferenciación (CD).

El valor de los antígenos CD para clasificar a los linfocitos es enorme, la mayor parte de los linfocitos T colaboradores son CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, y la mayoría de los linfocitos T citotóxicos son CD3⁺, CD4⁻, CD8⁺. Esto ha permitido identificar las células que participan en diferentes respuestas inmunitarias, aislar y analizar individualmente su especificidad, patrones de respuesta y funciones efectoras; además, de ser utilizados también para definir alteraciones específicas en ciertas subpoblaciones de linfocitos que podrían actuar en varias enfermedades (Abbas *et al.*, 2002).

3.2 Función de las proteínas CD3, CD4 Y CD8

Las proteínas CD3, CD4 y CD8 son cadenas polipeptídicas. Las proteínas CD3 relacionan el reconocimiento del antígeno por el TCR (receptor de células T) con los fenómenos bioquímicos que conducen a la activación funcional de las células T. Los CD4 se expresan en forma de monómero en la superficie de células T periféricas, timocitos, fagocitos mononucleares y en algunas células dendríticas. La mayoría de las

moléculas CD8 existen en forma de heterodímeros. Los CD4 y CD8 facilitan la adhesión de las células T restringidas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) a células presentadoras de antígeno (APC) y células diana en virtud de su afinidad específica por las moléculas del MHC, participan en la transducción de señales tempranas que tienen lugar tras el reconocimiento de la célula T de los complejos péptido-MHC sobre las APC (Goldsby *et al.*, 2004).

La proteína CD4 cumple un papel primordial en el proceso de infección del HIV ya que sirve como molécula de anclaje y entrada al linfocito T CD4+, monocitos y células dendríticas (que también expresan la proteína CD4) (Abbas *et al.*, 2002).

4. CITOMETRÍA DE FLUJO E INMUNOFENOTIPIFICACIÓN

La citometría de flujo es una técnica que permite un análisis celular multiparamétrico de manera rápida, sensible, específica y precisa. Los citómetros de flujo analizan células en suspensión que interfieren de forma individual con una fuente de luz. La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permite diferenciar poblaciones celulares dentro de la muestra analizada, por su tamaño relativo (FSC), por sus granulaciones y complejidad interna (SSC) o bien por su reactividad con fluorocromos previa incubación con diversos anticuerpos monoclonales. Es un método de lectura rápido, que permite analizar un elevado número de células (de 10,000 a 50, 000 para cada anticuerpo monoclonal) y proporciona un registro computarizado de los resultados (Abbas *et al.*, 2002).

4.1 Citómetro de flujo FACScan.- El equipo consta principalmente de tres compartimentos funcionalmente distintos: sistema de flujo, óptico y electrónico, así como un láser de Argón enfriado por aire (488 nm). El primero de ellos es

responsable de crear un flujo axial de líquido isotónico que obliga a las células en estudio a pasar a gran velocidad, pero en forma secuencial y aislada, a través de una celda capilar, donde las células son incididas por un rayo láser, que es dispersado en todas direcciones al chocar con ellas. La magnitud de la dispersión del láser en ángulos cercanos a 0° es directamente proporcional al tamaño de la célula (FSC) y es medida y registrada por un fotodetector situado delante de la fuente luminosa. Por su parte, la magnitud con que se dispersa la luz en ángulos cercanos a 90°, es proporcional a la textura (SSC) y es medida y registrada por un fotomultiplicador situado en posición ortogonal a la posición del rayo láser. Con esta información un microprocesador asigna, para cada célula, un valor de tamaño y textura; adicionalmente a esto, cuando las muestras han sido marcadas con moléculas fluoresceinadas, como anticuerpos monoclonales marcados con fluorocromos, el mismo rayo láser excita a los fluorocromos, quienes emiten luz con longitudes de onda diferentes, que son detectadas, previa filtración y reflexión por fotomultiplicadores adicionales, de tal forma que el microprocesador colecta además información sobre la presencia e intensidad de fluorescencia en cada célula, lo cual nos permite aislar a un grupo celular y obtener información sobre la presencia de fluorocromos únicamente en esa población (Janeway *et al.*, 2003).

4.2 Inmunofenotipaje.- Es la identificación de antígenos mediante anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos, que permite la identificación y clasificación de diferentes células tanto normales como patológicas. El isotiocianato de fluoresceína (FICT), la ficoeritrina (PE) y la proteína clorofila de Peridinin (PerCP) son los fluorocromos más empleados en el marcaje de anticuerpos monoclonales. Todos ellos se excitan a 488 nm (luz azul) y emiten una longitud de onda característica en la zona del verde (514 nm), naranja (580 nm) y rojo (670 nm).

5. CULTIVO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS

La metodología convencional para medir la proliferación de las células sanguíneas es determinada *in vitro* incubando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con un determinado agente mitogénico y midiendo la cantidad de DNA sintetizado recientemente mediante la incorporación de timidina tritiada (Fletcher *et al.*, 1997). Varios investigadores han reportado que la sangre total diluída puede ser utilizada en lugar de PBMC para la detección de las respuestas proliferativas frente a mitógenos y antígenos, reportando incluso una mejor y mayor respuesta proliferativa frente al cultivo de PBMC (Gaines *et al.*, 1996; Lim *et al.*, 1998 y Wang *et al.*, 2002;). El uso de sangre total en lugar de PBMC tiene varias ventajas prácticas:

- a) Se requiere un menor volumen de sangre,
- b) Es fácil de realizar y la muestra está expuesta a menor manipulación,
- c) Requiere menor tiempo, requerimiento de equipos y el costo es reducido (Gaines *et al.*, 1996).

Asimismo, las células del sistema inmune son mantenidas en un ambiente mas similar al hallado *in vivo*, pudiendo obviar las distorsiones en las proporciones relativas de los subpoblaciones de linfocitos durante los procedimientos de separación o posible pre-activación inducida por los procedimientos de aislamiento, siendo además cultivados en un medio mas natural que es el plasma autólogo (Bocchieri *et al.*, 1995). Asimismo en cultivos de sangre total de individuos HIV⁺ se obtuvo una mejor correlación con el estado de la enfermedad que el cultivo de PBMC, el número de cambios importantes en el fenotipo de los marcadores de superficie de las poblaciones de linfocitos en los sujetos HIV⁺ incluyendo CD4⁺, CD8⁺, la relación CD4⁺/CD8⁺ y ciertas subpoblaciones de CD8⁺, pudieron ser correlacionadas en los cultivos de sangre total mas nó en los cultivos de PBMC.

6. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV) Y SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA (SIDA)

6.1 SIDA

En América Latina, unas 140 000 personas se infectaron por el HIV el 2007, lo que eleva a 1,7 millones el número de personas que viven con el virus. Hay aproximadamente 2,2 millones de niños menores de 14 años infectados y el 2007, el SIDA cobró unas 63 000 vidas. Para el caso de Perú se estima que el 2007 hubo 76000 personas entre adultos y niños infectados con el HIV (ONUSIDA, 2008).

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fue detectado a principios de los años 80 y desde entonces se ha convertido en la mayor epidemia a nivel mundial que afecta a más de 35 millones de personas. El SIDA es causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Este síndrome, produce la paulatina destrucción del sistema inmunológico por microorganismos que generalmente no causan daño o causan un daño mínimo, se tornan altamente peligrosos porque se diseminan y agreden el organismo al estar disminuída la defensa inmune, originando así una variada gama de enfermedades (cuadros de diarrea, neumonías atípicas, cánceres, tuberculosis, degeneración del sistema nervioso central, etc.) (Abbas *et al.*, 2002).

6.2 HIV

El HIV infecta diversas células del sistema inmunitario, como las células T colaboradoras que expresan CD4, los monocitos y las células dendríticas (Goldsby, 2004).

El HIV forma parte de la familia Retroviridae y pertenece al género Lentivirus. Este virus presenta dos variantes: HIV-1 y el HIV-2 teniendo las dos una homología del

40% en sus ácidos nucleicos, el HIV-1 está presente mayormente en EEUU y el HIV-2 en África Occidental (Abbas, 2002).

Una partícula del HIV infecciosa está formada por cadenas idénticas de RNA cada una de aproximadamente 9.2 kilobases (kb) de longitud, empaquetadas dentro de un centro de proteínas virales, y rodeadas de una envoltura formada por una bicapa fosfolipídica derivada de la membrana celular del huésped, pero que incluye proteínas de membranas codificadas por el virus (Goldsby, 2004).

a) Etapas de la infección y patogenia por el HIV

La enfermedad comienza con una infección aguda solo parcialmente controlada por una respuesta inmunitaria adaptativa, y evoluciona a una infección progresiva crónica de los tejidos linfoides periféricos (Abbas, 2002).

Tras la infección aguda inicial, se desarrolla una segunda fase de la enfermedad, durante la cual los ganglios linfáticos y el bazo se convierten en sitios de replicación continua del HIV y de destrucción tisular. Durante este periodo de la enfermedad, el sistema inmunitario permanece competente y es capaz de controlar la mayoría de las infecciones debidas a otros microorganismos, existen escasas o nulas manifestaciones clínicas de la infección por el HIV. Por consiguiente, esta fase de la enfermedad a menudo recibe el nombre de fase de latencia clínica o estadio B. No obstante la destrucción de las células T CD4 en los tejidos linfoides progresa ininterrumpidamente (Janeway, 2003).

La infección por el HIV progresa hacia la fase final y casi siempre mortal, denominada SIDA, conocido como el estadio C, en la que la destrucción del tejido linfoide periférico es básicamente total, descendiendo el recuento de células T CD4⁺

en la sangre por debajo de 200 células (Abbas *et al.*, 2002). Ya que el daño al sistema inmunológico es más grave, las personas HIV positivas pueden padecer infecciones oportunistas denominadas así porque son causadas por organismos que generalmente no causan enfermedad en personas inmunocompetentes y emergen en las personas con un sistema inmunológico comprometido. Algunas de las infecciones oportunistas más comunes incluyen la neumonía por *Pneumocystis jiroveci* (PCP), el complejo *Mycobacterium avium* (MAC), el citomegalovirus (CMV), la toxoplasmosis, y la candidiasis (Abbas, 2002).

7. INMUNOESTIMULACIÓN MEDIANTE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS

Un inmunoestimulante es aquella sustancia capaz de modificar el normal funcionamiento del sistema inmune (Hayakawa *et al.*, 1998).

Actualmente hay una amplia literatura sobre las propiedades inmunoestimulantes de los metabolitos secundarios de plantas (Fidan *et al.*, 2008; Lyu y Park, 2007; Adhvaryu *et al.*, 2007; Reyes *et al.*, 2006; y Franco *et al.*, 2003). Un clásico ejemplo se puede encontrar en *Uncaria tomentosa* identificándose los alcaloides isomitrafalina y pteropudina que tienen la propiedad de aumentar la actividad fagocítica de los granulocitos, neutrófilos y macrófagos humanos; otros metabolitos secundarios como los flavonoides, saponinas, glicósidos entre otros también han presentado propiedades inmunoestimulantes (Akbay *et al.*, 2003; Yesilada *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2001 y Pugh *et al.*, 2001).

El patrón de inmunoestimulación de los metabolitos secundarios puede presentar una amplia variación, así algunos compuestos pueden estimular a muchas células del sistema inmunitario, como es el caso de los alcaloides de *U. tomentosa* o los sesquiterpenos glicósidos de *Dendrobium nobile*, que fueron capaces de estimular la proliferación de linfocitos B y T murinos *in vitro* (Zhao *et al.*, 2001); y otras

pueden actuar estimulando específicamente un solo tipo celular, como el caso del polisacárido ácido arabinogalactano que aumentó el número de linfocitos T CD4 (Stein *et al.*, 1999). Estas propiedades inmunoestimulantes específicas de los metabolitos secundarios son importantes en los procesos de respuesta del sistema inmunológico, donde el balance de las citoquinas Th1/Th2 presenta un patrón patológico, así por ejemplo el compuesto ginsenoside, denominado como RG2 en *Panax ginseng* fue capaz de incrementar la actividad de las células T CD4⁺ del tipo Th1, promoviendo la expresión de los genes de la IL-2 en los esplenocitos murinos, pudiendo ser útil para corregir aquellos trastornos patológicos donde predomina un tipo de respuesta Th2 (Lee *et al.*, 2004).

Este efecto de inmunoestimulación también puede ser de gran ayuda en los casos de enfermedades que suprimen el sistema inmunológico como el SIDA, recientemente Bot *et al.* (2007) encontraron que el extracto del fruto de *Momordica balsamica* tiene la capacidad de incrementar el número de linfocitos T CD4⁺ en el cultivo de PBMC de individuos HIV⁺; pero además de la pérdida de células T CD4⁺ en la infección por el HIV, también existen cambios cualitativos de la expresión de citocinas Th1/Th2, encontrándose un anormal predominio de una respuesta Th2 (Klein *et al.*, 1997); para este caso, Breytenbach *et al.* (2001) demostraron que una mezcla de esteroides vegetales tuvo la capacidad de incrementar un tipo de respuesta Th1 en cultivos de células sanguíneas de individuos HIV⁺, lo que hace promisoría la propiedad que puedan tener otros extractos de plantas con capacidad de estimular la respuesta inmune de células humanas en los individuos HIV⁺.

Los resultados obtenidos en investigaciones realizadas por Alzamora *et al.*, (2007) para *L. peruvianum* Ch. demostraron que el extracto metanólico del ecotipo morado de maca tiene la capacidad de inducir la producción de interferón – γ (IFN- γ) en el cultivo de linfocitos T humanos, por lo que es muy probable que pueda presentar actividad inmunoestimulante en personas inmunosuprimidas HIV-1⁺.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1 HIPOTESIS

- Los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Lepidium. peruvianum* presentan diferente actividad sobre los cultivos de leucocitos procedentes de individuos saludables, e infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

2 OBJETIVO GENERAL

- Comparar la actividad de tres tipos de extractos (clorofórmico, metanólico y acuoso) de *Lepidium peruvianum* Chacón en cultivos de leucocitos procedentes de individuos saludables, e infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el extracto con mayor actividad en el cultivo de leucocitos procedentes de personas saludables.
- Determinar el extracto con mayor actividad en el cultivo de leucocitos de personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).
- Determinar la población leucocitaria sobre la cual actúan los extractos en los individuos saludables, e infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).
- Determinar la actividad de los extractos sobre la población de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ (T cooperadores) y CD3⁺CD8⁺ (T citotóxicos/supresores) en individuos saludables, e infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1 ELABORACIÓN DE LOS EXTRACTOS

1.1 Obtención del material biológico

Las raíces del ecotipo amarillo de *L. peruvianum* Ch. fueron colectadas en la ciudad de Chupaca, Junín (12° 04' 00" S, 75° 16' 59" O) entre febrero y marzo del 2004, trasladados al Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y conservadas en un ambiente fresco.

1.2 Elaboración de los extractos de *Lepidium peruvianum* Chacón

La elaboración de los extractos se realizó según Alzamora, 2002. Las raíces de maca fueron limpiadas cuidadosamente sacándole las raicillas y cortándose la parte de la base y la superficie. Luego se procedió a cortarlas en trozos muy pequeños e inmediatamente fueron secados en estufa de aire circulante a una temperatura de 45 °C por espacio de dos días. Inmediatamente se procedió a la trituration en un molino manual, se llevó a polvo fino en una licuadora y finalmente se tamizó, conservando el material en recipientes estériles hasta la elaboración de los extractos.

a) Extracto Acuoso (EAc).- Se maceró 300 g de polvo fino de *L. peruvianum* Ch. con 950 mL de agua destilada estéril en un frasco de vidrio de color oscuro (para evitar la reacción con la luz) a una temperatura de 10 °C durante 2 semanas, agitándose diariamente durante 5 minutos. Finalmente se filtró al vacío, utilizando papel Whatman y se liofilizó hasta concentrar a 3 % del filtrado. El extracto se conservó en viales de boca ancha sellados y rotulados a una temperatura de 4 °C.

b) Extracto Metanólico (EM).- Se procedió de la misma manera que en el caso anterior utilizando como solvente 600 mL de metanol. En un vaso de precipitado se obtuvo 700 mL de extracto filtrado, el cual se procedió a concentrar en estufa de aire circulante, a una temperatura de 45 °C hasta concentrar a la cuarta parte del volumen inicial. Finalmente, se dejó evaporar todo el metanol en placas Petri dentro de una estufa a 40 °C. El extracto se colectó y conservó en viales de boca ancha sellados y rotulados, a una temperatura de 4 °C.

c) Extracto Clorofórmico (EC).- Se maceraron 300 g de polvo fino *L. peruvianum* Ch. con 600 mL de metanol en frascos de boca ancha oscuros durante 10 días a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se procedió a filtrar al vacío, utilizando papel Whatman, obteniéndose 700 mL de solución, seguidamente se procedió a concentrar a 45 °C en estufa de aire circulante hasta obtener la cuarta parte del volumen inicial (EM). El EM se reguló a pH 5 empleando ácido clorhídrico al 10 % y se trasvasó a una pera de separación. Se realizó el lavado del EM agregando benceno QP V/V, se agitó fuertemente por varios minutos hasta mezclar completamente, luego de lo cual se dejó en reposo para que se definan las fases acuosa y bencénica. La fase acuosa se colocó en la parte inferior de la pera y la fase bencénica en la superior. Se recuperó la fase acuosa en un vaso de precipitado y se le ajustó el pH a 9 empleando hidróxido de amonio (NaOH) concentrado, se transfirió a una pera de separación y se realizó la extracción empleando cloroformo hasta agotamiento, se agitó y se dejó un promedio de una hora hasta definición de las fases acuosa y clorofórmica. La fase acuosa (metanólica) se ubicó en la parte superior de la pera y la fase clorofórmica en la parte inferior. La fase clorofórmica se secó con sulfato de sodio anhidro en partes iguales y luego se filtró con papel watman N 1 para evitar contaminación del extracto con la sal. La fase clorofórmica se concentró en un rotaevaporador hasta $\frac{1}{4}$ de su volumen, se recuperó y se distribuyó en placas Petri, luego se procedió a secar en estufa a 40 °C hasta obtener la completa evaporación del

cloroformo. El extracto se colectó y conservó en viales de boca ancha sellados y rotulados, a una temperatura de 4 °C.

1.3 Reacciones Cualitativas para el Reconocimiento de Algunos Metabolitos Secundarios en los Extractos de *Lepidium peruvianum* Chacón

Para la detección de saponinas se tomaron 50 mL de cada extracto y se agitaron manualmente por 5 minutos observándose la formación y mantenimiento de espuma durante un tiempo de por lo menos 5 minutos (Domínguez, 1973).

La prueba de flavonoides se realizó por la reacción de Shinoda, dando positivo por el viraje a un color rojo intenso.

Para detectar alcaloides se empleó el reactivo de Dragendorff que contienen sales de ácidos de metales pesados (yoduro de bismuto y potasio) las cuales forman precipitados, una coloración naranja indicará presencia de alcaloides (Domínguez, 1973).

2. SELECCIÓN DE CASOS

a) Individuos Saludables. El estudio se realizó en 5 individuos, con edades entre 20 y 30 años, todos sanos seleccionados cuidadosamente. Sin ningún riesgo de exposición para el HIV (los datos en cuanto a sexo y edad están presentados en el anexo 1).

b) Individuos HIV⁺. Para el estudio se seleccionaron 5 individuos portadores del HIV-1⁺, pacientes del hospital Rezola de Cañete, 2 pertenecientes al estadio B y 3 al estadio C, previo consentimiento verbal informado. Las edades de los individuos oscilaron entre 18 y 40 años. No se pudo contar con más voluntarios debido en parte a

la desconfianza que se le revelara su identidad de ser portador del HIV (los datos en cuanto a sexo y edad están presentados en el anexo 2).

2.1 Obtención de las células sanguíneas

Las células sanguíneas fueron obtenidas por punción intravenosa en tubos Vacutainer estériles con heparina de sodio como anticoagulante. Una vez obtenidas las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente (20-25 °C) hasta su procesamiento dentro de las 3 horas siguientes.

3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS EXTRACTOS *Lepidium peruvianum* Chacón EN EL CULTIVO DE LEUCOCITOS

3.1 Preparación de los Extractos para el Cultivo de Células Sanguíneas

Los tres extractos, se prepararon a una concentración final de 800 µg/mL empleando el medio de cultivo RPMI (extendido) como diluyente e inmediatamente fueron esterilizados por filtración, utilizando para ello una jeringa de vidrio y Membranas Millipore® de 0.2 µm de porosidad, luego de lo cual fueron almacenados en frascos de tapa rosca estériles a 10 °C hasta su uso.

3.2 Cultivo de las Células Sanguíneas

Para evaluar el perfil de los extractos sobre los leucocitos, se cultivaron células sanguíneas obtenidas en tubos Vacutainer que fueron repartidas en 4 tubos de poliestireno (12 x 75 mm), previamente esterilizados, a razón de 200 µL por cada tubo y se les adicionó 50 µL de cada extracto (800 µg/mL) a cada uno de los tubos por separado (Figura1 y Tabla 1).

Tabla 1. Distribución y cantidad de las células sanguíneas.

	TUBO 1 (extracto clorofórmico)	TUBO 2 (extracto acuoso)	TUBO 3 (extracto metanólico)	TUBO 4 (control negativo)
Células sanguíneas *	200 µL	200 µL	200 µL	200 µL
Extracto alcaloidal	50 µL			
Extracto acuoso		50 µL		
Extracto metanólico			50 µL	
Medio de cultivo RPMI				50 µL

* Se procedió de igual forma para las células sanguíneas de personas saludables e individuos HIV-1 ⁺.

3.3 Condiciones de cultivo

El cultivo se realizó en una cámara de siembra previamente esterilizada mediante luz ultravioleta. Cada muestra sanguínea se procesó por triplicado.

Los cultivos fueron incubados en una estufa a 37 °C por 16+/-1 h, luego de lo cual se procedió a realizar el recuento celular.

3.4 Recuento de los Glóbulos Blancos (Leucocitos)

El efecto de los extractos sobre la proliferación celular de los leucocitos fue determinado mediante el cultivo de las células sanguíneas en presencia de cada extracto. El recuento para el número de leucocitos y sus estirpes celulares evaluadas en este estudio (eosinófilos, neutrófilos, monocitos y linfocitos) se realizó mediante hemogramas manuales realizados en el Laboratorio Clínico "Rihmen Medic". Los resultados se muestran en los anexos 3 a 7.

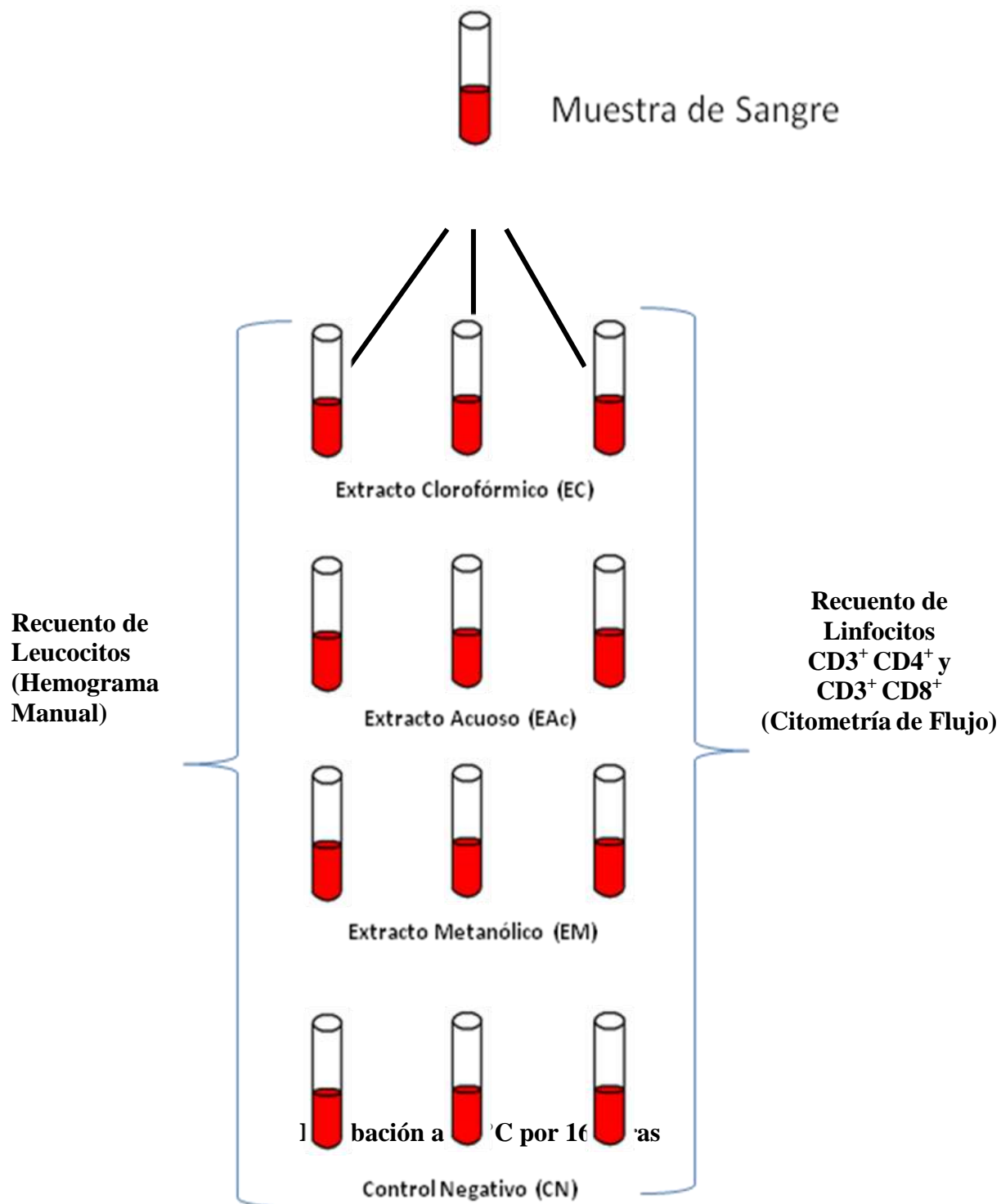


Figura 1. Protocolo realizado para cada muestra sanguínea tanto de las personas saludables como de las HIV-1⁺.

4. DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN DE LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS T CD3⁺CD4⁺ (COOPERADORES) Y CD3⁺CD8⁺ (CITOTÓXICOS)

Para la caracterización y cuantificación de linfocitos CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ mediante citometría de flujo se utilizó un “kit” comercial: TriTEST TM. El uso de reactivos TriTEST TM (lisis sin lavado) permite identificar la población de linfocitos T a través del reconocimiento del antígeno de diferenciación CD3 por el anticuerpo monoclonal anti CD3-FICT y de sus subpoblaciones CD4⁺ y CD8⁺ por anti CD4-PE y anti CD8-PE. Para lo cual se realizó lo siguiente:

Por cada muestra se prepararon 2 tubos, cada uno con una de las mezclas de anticuerpos monoclonales que se listan a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2. Distribución de los anticuerpos monoclonales.

Tubo	Combinación de Anticuerpo (*)	Tipo celular enumerado
1	CD3/CD4/CD45	Linfocitos T cooperadores / inductores
2	CD3/CD8/CD45	Linfocitos T citotóxicos /supresores

(*) Anticuerpos marcados con FITC / PE / PerCP respectivamente (Reactivos TriTESTTM).

La presencia del marcador molecular CD45 permite descartar todo elemento que no sea leucocito como eritrocitos nucleados, partículas, etc.

A cada tubo se le agregó 50 µL de sangre periférica y 20 µL de la respectiva mezcla de anticuerpos monoclonales por un periodo de incubación de 20 minutos, después de lo cual se le agregó a cada tubo 450 µL de una solución lisante hipotónica

(BD FACS *lysing*), que lisa los glóbulos rojos, durante 30 minutos a 4 °C y en oscuridad.

4.1 Análisis en el Citómetro de Flujo

Se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACScan de Marca, Becton Dickinson. La adquisición y análisis de los datos se realizó empleando el software MultiSET Versión 1.0.1. Se leyó un total de 10,000 leucocitos CD45⁺ para todas las muestras, analizándose un mínimo de 2000 linfocitos dentro de la región.

Los resultados fueron reportados en gráficas de punto mostrando las combinaciones de anticuerpos empleados, con las cantidades relativas (porcentajes respecto a los linfocitos totales) de las subpoblaciones linfocitarias.

4.2 Determinación del número de las subpoblaciones linfocitarias

Los valores absolutos de las poblaciones linfocitarias: CD45⁺/CD3⁺/CD4⁺ y CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺ fueron obtenidos reemplazando los valores relativos hallados mediante citometría de flujo, en el número de linfocitos obtenidos a través de los hemogramas manuales.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS (versión 15) y se expresaron como la media \pm desviación estándar, las diferencias entre grupos se determinaron mediante la prueba t de Student, con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

Los tres extractos, luego del proceso de secado y/o liofilizado, adquirieron una consistencia gomosa. El extracto con mayor rendimiento fue el acuoso, obteniéndose por cada 100 g de maca 3.3 g del extracto representando aproximadamente el 3 %, seguido del metanólico con un 0.9 % y al final el clorofórmico con un 0.4 % (Tabla 3).

TABLA 3. Rendimiento de los Extractos

CARACTERISTICA	TIPO DE EXTRACTO		
	Acuoso	Clorofórmico	Metanólico
Rendimiento* (g)	3.288	0.385	0.9

* Rendimiento de los extractos por cada 100 g de maca.

Se confirmó la presencia de saponinas, flavonoides y alcaloides. La prueba para detección de saponinas fue positiva para los extractos acuosos y metanólico (Tabla 4) siendo mayor en el extracto acuoso donde la formación de espuma fue en mayor cantidad y por un tiempo mayor a 15 minutos.

En la prueba para la detección de flavonoides (reacción de Shinoda) los tres extractos fueron positivos (Tabla 4).

En cuanto a la prueba de alcaloides por el reactivo de Dragendorff los tres extractos fueron positivos (Tabla 4) siendo mayor para los extractos clorofórmico y metanólico y en menor grado para el extracto acuoso.

TABLA 4. Presencia de Metabolitos Secundarios

Metabolitos Secundarios	Extracto Acuoso	Extracto Metanólico	Extracto Clorofórmico
Saponinas	+++	+	-
Flavonoides	+	+	+
Alcaloides	±	++	+++

+: hay reacción ±: reacción muy débil -: no hay reacción

1. ACTIVIDAD DE LOS TRES EXTRACTOS DE *Lepidium peruvianum* Chacón EN EL CULTIVO DE LEUCOCITOS

1.1 Cultivo de Células sanguíneas de personas saludables

Los resultados del número de leucocitos con los tres extractos de *L. peruvianum* Ch. son presentados en la Tabla 5.

TABLA 5. Recuento de leucocitos y sus principales estirpes celulares para el cultivo de las células sanguíneas de personas saludables.

TRATAMIENTO	LEUCOCITOS (No Cel. ± Desv.)	LINFOCITOS (No Cel. ± Desv.)	NEUTRÓFILOS (No Cel. ± Desv.)	EOSINÓFILOS (No Cel. ± Desv.)	MONOCITOS (No Cel. ± Desv.)
EC	5044 ± 285	1932 ± 85	2927 ± 214	72 ± 24	122 ± 9
EAc	4532 ± 268	1644 ± 86	2717 ± 214	70 ± 22	110 ± 8
EM	4403 ± 232	1595 ± 85	2647 ± 168	56 ± 18	108 ± 17
CN	4183 ± 232	1378 ± 71	2624 ± 182	63 ± 12	118 ± 12

EC : Extracto clorofórmico , EAc: Extracto acuoso, EM : Extracto metanólico, CN : control negativo.

Los tres extractos lograron incrementar el número de leucocitos respecto al control (Figura 2) presentando un incremento de 21, 8 y 5 % para el extracto clorofórmico, acuoso y metanólico respectivamente (tomando como 100 % al número

de células del control negativo); sin embargo, no pudieron encontrarse diferencias significativas (Tabla 6).

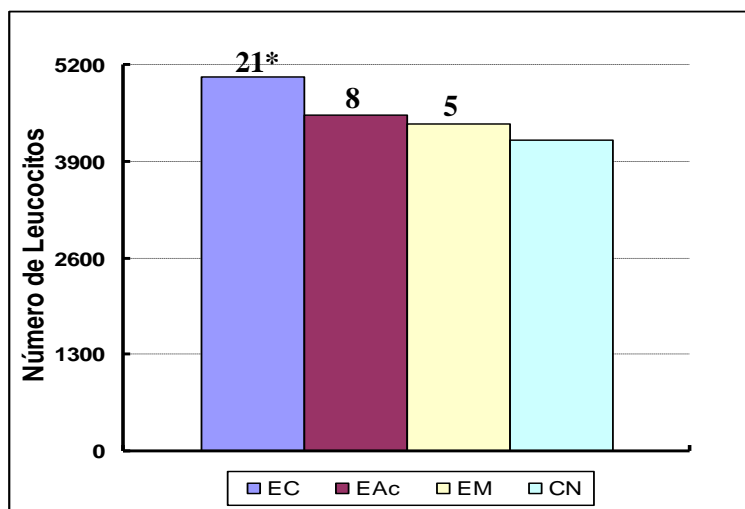


FIGURA 2. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de leucocitos de personas saludables. Todos los extractos tuvieron una concentración final de 800µg/mL, como control negativo se utilizó el medio de cultivo RPMI. EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo.
* **Porcentaje de incremento celular (tomando como 100 % al número de células del control negativo).**

TABLA 6. Significancia estadística* (p) del recuento de las células sanguíneas de personas normales para cada extracto.

TRATAMIENTO	LEUCOCITOS	LINFOCITOS	NEUTRÓFILOS	EOSINÓFILOS	MONOCITOS
EC	0,1020	0.0033	0,5082	0,9208	0,6921
EAc	0,5375	0,0852	0,9879	0,5945	0,2328
EM	0,7212	0,1477	0,8411	0,9677	0,7508

EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico.

***Entre la media del control y la media del respectivo tratamiento.**

En cuanto a las 4 estirpes celulares de leucocitos (linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos) fue el extracto clorofórmico el que causó un mayor incremento (Figura 3) encontrándose para el número de linfocitos un incremento significativo ($p=0.0033$) respecto al control (Tabla 6). El extracto acuoso logró un incremento del 19 y 11 %, para el número de linfocitos y eosinófilos respectivamente (Figuras 3a y c), y

mostró una disminución del -7% (tomando como 100 % al número de células del control negativo) para el número de monocitos (Figura 3d), no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las estirpes celulares (Tabla 6).

Respecto al extracto metanólico, se logró un incremento del 16% para el número de linfocitos (Figura 3a) y se mantuvo invariable para el número de neutrófilos (Figura 3b), en cuanto a los eosinófilos y monocitos presentaron una disminución respecto al control (-11 y -8 %, Figuras 3c y d), no se encontraron diferencias significativas para ninguna estirpe celular (Tabla 6).

1.2 Cultivo de células sanguíneas de personas HIV-1 + Pertenecientes al Estadio B

Los resultados del número de leucocitos y sus estirpes celulares, para los 2 individuos pertenecientes al estadio B, con los tres tipos de extractos de *L. peruvianum* Ch. son mostrados en la Tabla 7. El extracto que logró un mayor incremento del número de leucocitos respecto al control fue el clorofórmico presentando un porcentaje de incremento celular de 45 y 35 % para el individuo 1 y 2 respectivamente (Figura 4).

TABLA 7. Recuento de leucocitos y sus principales estirpes celulares para el cultivo de las células sanguíneas de personas HIV-1+ pertenecientes al estadio B.

IND.	TRATAMIENTO	LEUCOCITO (No Cel.)	LINFOCITO (No Cel.)	NEUTRÓFILO (No Cel.)	EOSINÓFILO (No Cel.)	MONOCITO (No Cel.)
1	EC	4167	1473	2548	63	85
	EAc	3033	960	1995	50	75
	EM	2900	879	1913	40	71
	CN	2867	800	1910	47	70
2	EC	3267	1132	1993	54	60
	EAc	2633	860	1641	48	58
	EM	2733	911	1713	46	46
	CN	2417	781	1571	40	40

EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico, CN: Control negativo.

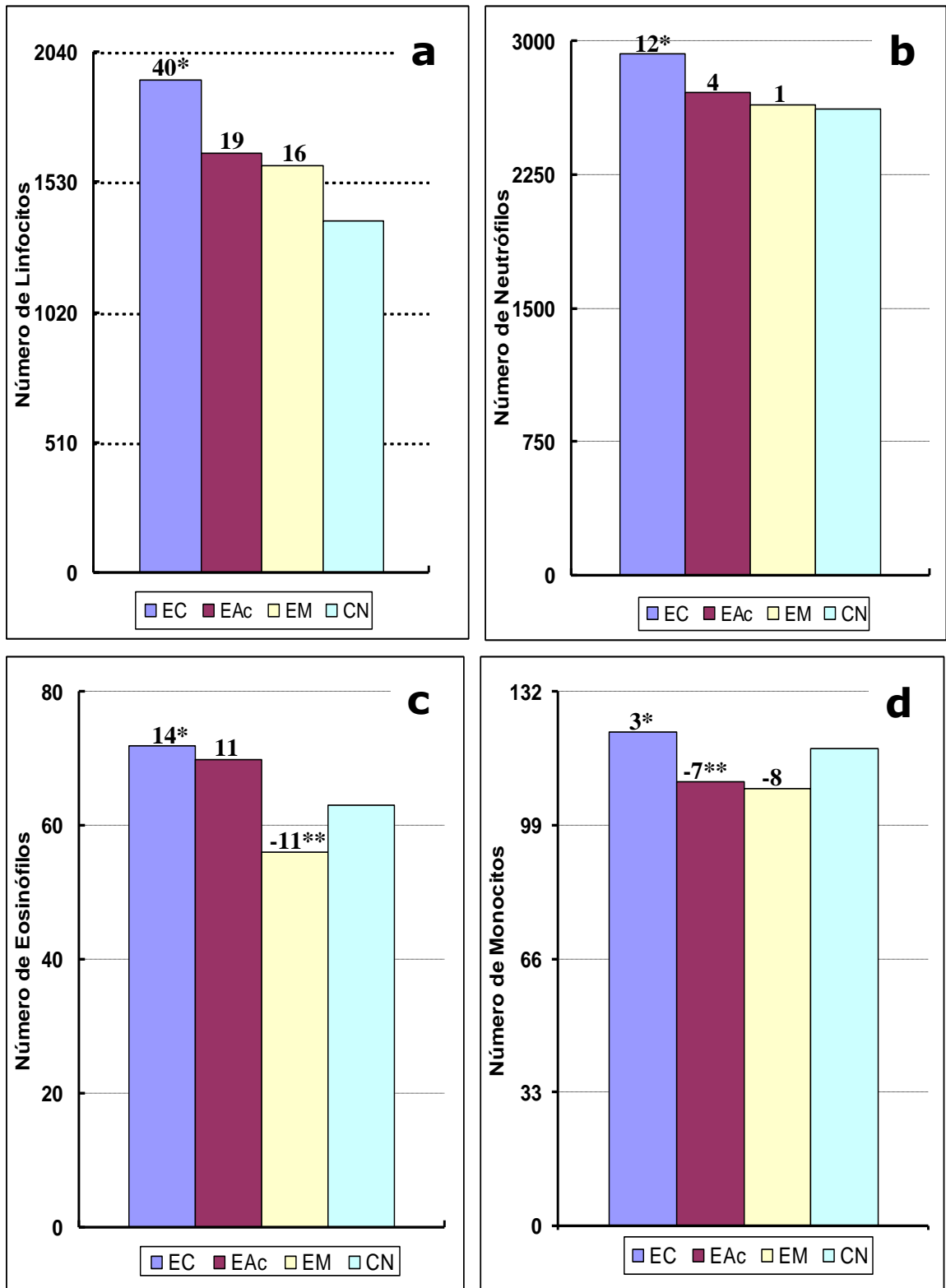


FIGURA 3. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de las 4 estirpes celulares de leucocitos de personas saludables con los tres extractos. a) Recuento de Linfocitos, b) Recuento de Neutrófilos, c) Recuento de Eosinófilos y d) Recuento de Monocitos . EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo.

*** Porcentaje de incremento celular, ** Porcentaje de disminución celular (para ambos casos tomando como 100 % al número de células del control negativo).**

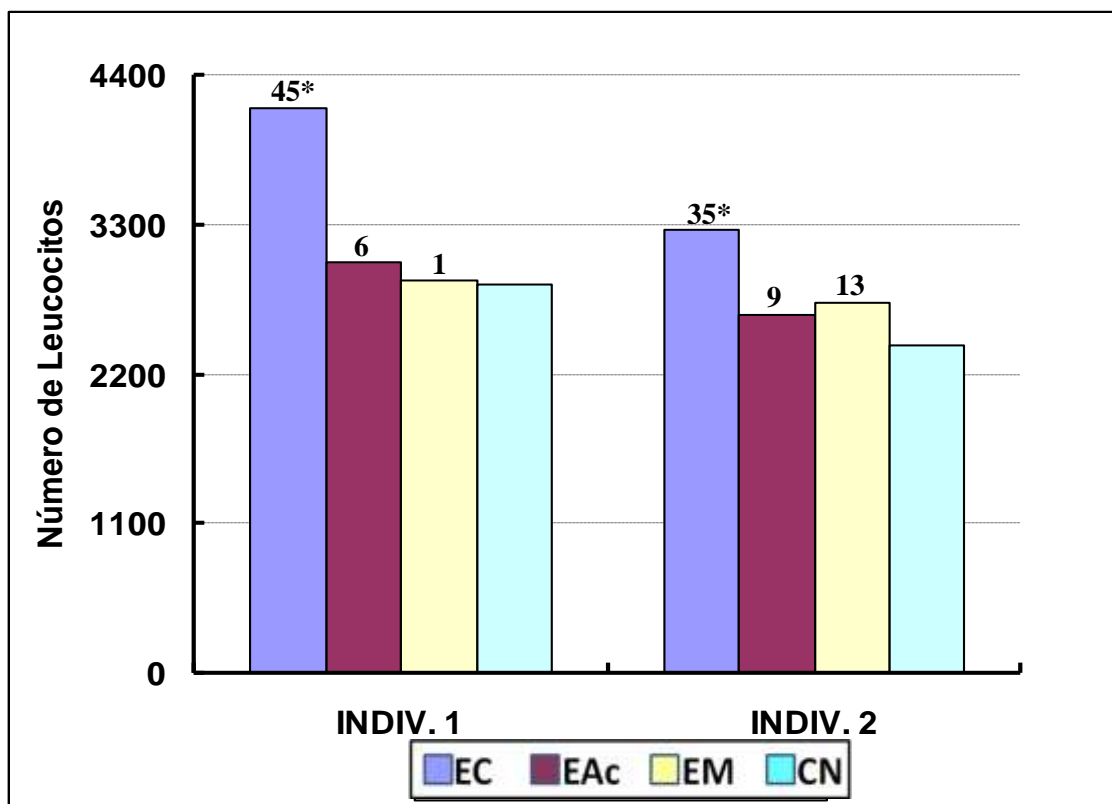


FIGURA 4. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de leucocitos de personas *HIV-1* + pertenecientes al estadio B. Todos los extractos tuvieron una concentración final de 800µg/mL, como control negativo se utilizó el medio de cultivo RPMI. EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo. * Porcentaje de incremento celular (tomando como 100 % al número de células del control negativo).

En cuanto a las 4 estirpes celulares de leucocitos, en ambos individuos, el extracto clorofórmico logró incrementar el número de células respecto al control sin extracto siendo mayor para el número de linfocitos (84 y 45 % para los individuos 1 y 2 respectivamente, Figura 5a).

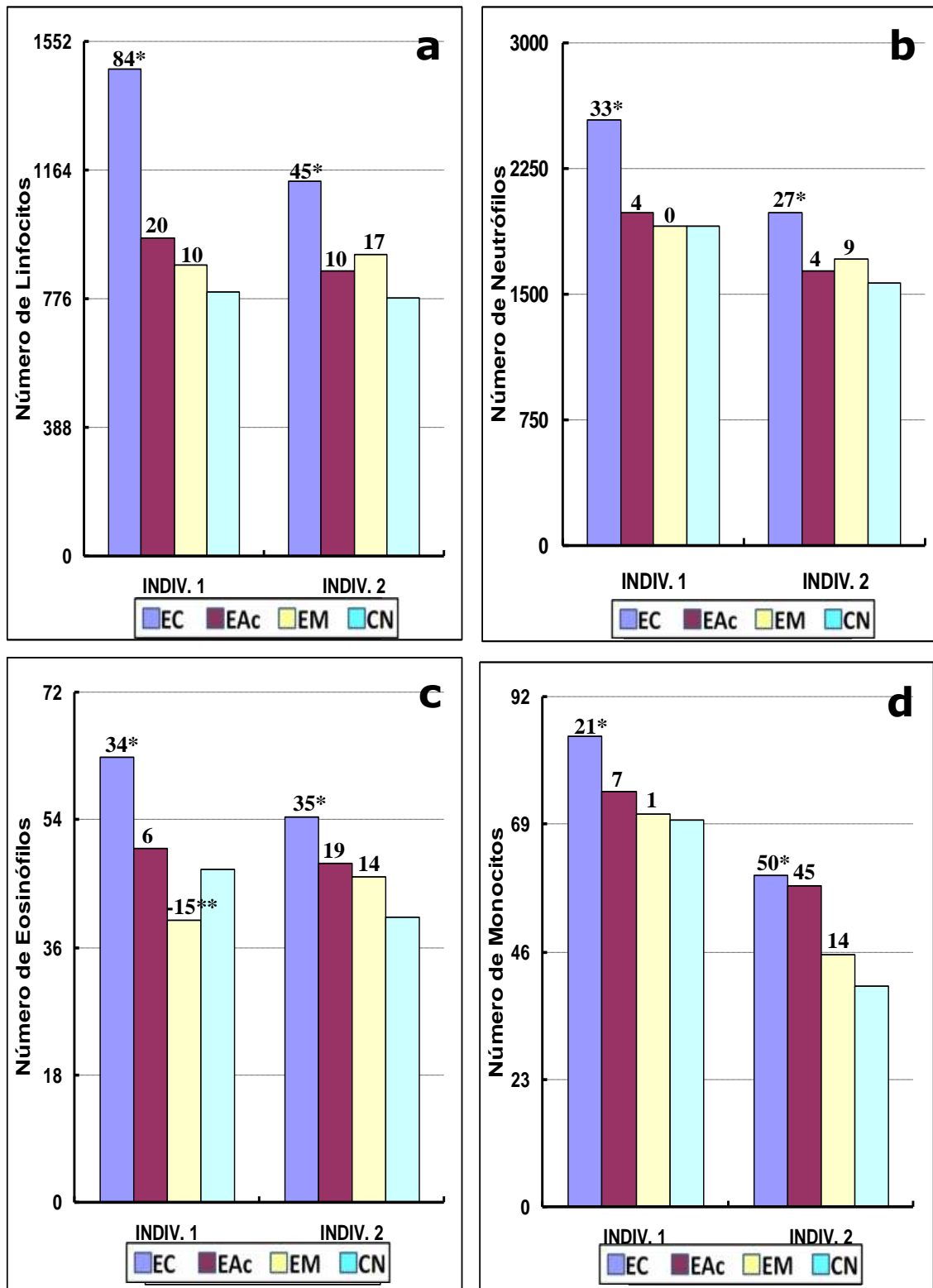


FIGURA 5. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de las 4 estirpes celulares de leucocitos de personas HIV + pertenecientes al estadio B con los tres extractos. a) Recuento de Linfocitos, b) Recuento de Neutrófilos, c) Recuento de Eosinófilos y d) Recuento de Monocitos . EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo.

* Porcentaje de incremento celular, ** Porcentaje de disminución celular (para ambos casos tomando como 100 % al número de células del control negativo).

El extracto acuoso logró incrementar el número de linfocitos, eosinófilos y monocitos presentando un mayor incremento de linfocitos, el individuo 1 (20 %, Figura 5a) y de eosinófilos y monocitos el individuo 2 (14 y 45 % respectivamente, Figura 5c y d). En cuanto al extracto metanólico este fue el que presentó los menores incrementos para las 4 estirpes celulares de ambos individuos y mostró una disminución del -15% respecto al control negativo para el número de eosinófilos del individuo número 1 (Figura 5d).

1.3 Cultivo de células sanguíneas de personas HIV-1 + Pertencientes al Estadio C

Los resultados obtenidos para los tres extractos se presentan en la Tabla 8. El extracto clorofórmico fue el que logró un mayor incremento del número de leucocitos (31%, Figura 6).

TABLA 8. Recuento de leucocitos y sus principales estirpes celulares para el cultivo de las células sanguíneas de personas HIV-1+ pertenecientes al estadio C.

TRATAMIENTO	LEUCOCITOS (No Cel.± Desv.)	LINFOCITOS (No Cel.± Desv.)	NEUTRÓFILOS (No Cel.± Desv.)	EOSINÓFILOS (No Cel.± Desv.)	MONOCITOS (No Cel.± Desv.)
EXTRACTO CLOROFÓRMICO	2367 ± 102	895 ± 26	1387 ± 77	43 ± 4	39 ± 4
EXTRACTO ACUOSO	1872 ± 202	676 ± 63	1132 ± 131	35 ± 5	33 ± 6
EXTRACTO METANÓLICO	1856 ± 197	658 ± 63	1141 ± 126	32 ± 6	25 ± 3
CONTROL NEGATIVO	1800 ± 222	640 ± 72	1093 ± 149	36 ± 6	32 ± 3

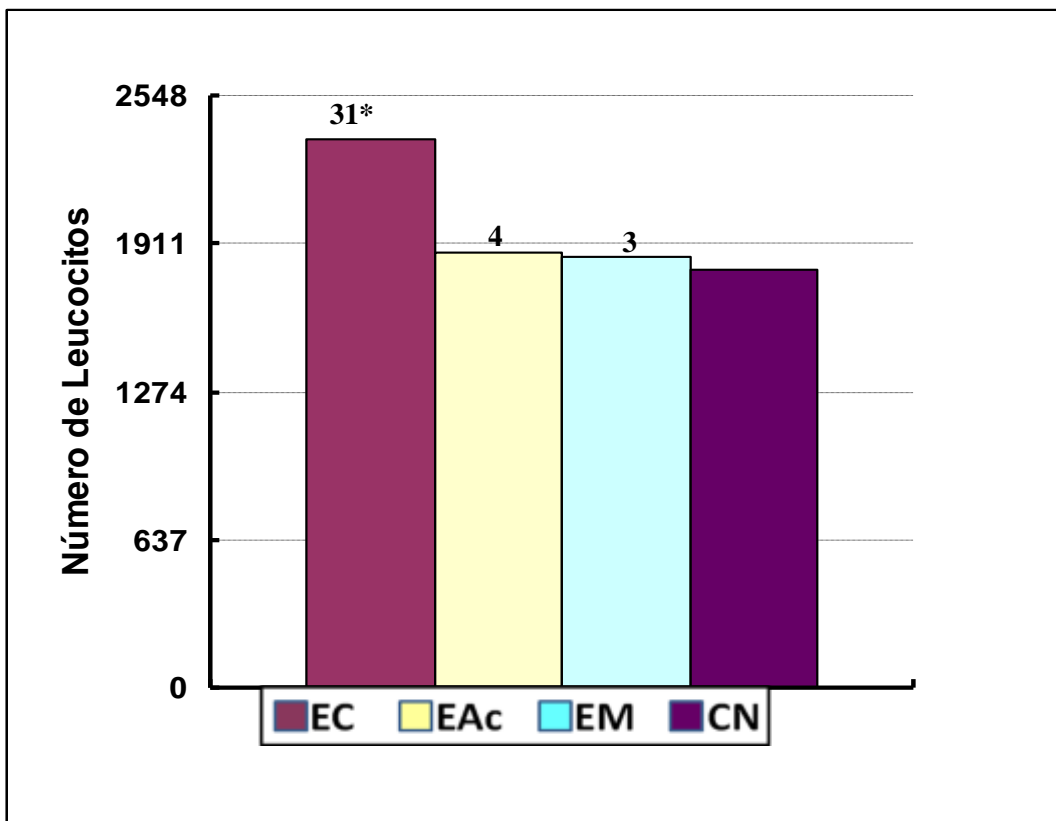


FIGURA 6. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de leucocitos de personas HIV + pertenecientes al estadio C. Todos los extractos tuvieron una concentración final de 800µg/mL, como control negativo se utilizó el medio de cultivo RPMI. EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo. * Porcentaje de incremento celular (tomando como 100 % al número de células del control negativo).

En cuanto a las 4 estirpes celulares el extracto clorofórmico fue el que logró un mayor incremento (Figura 7), encontrándose diferencias significativas para el número de linfocitos ($p= 0.0288$, Tabla 9).

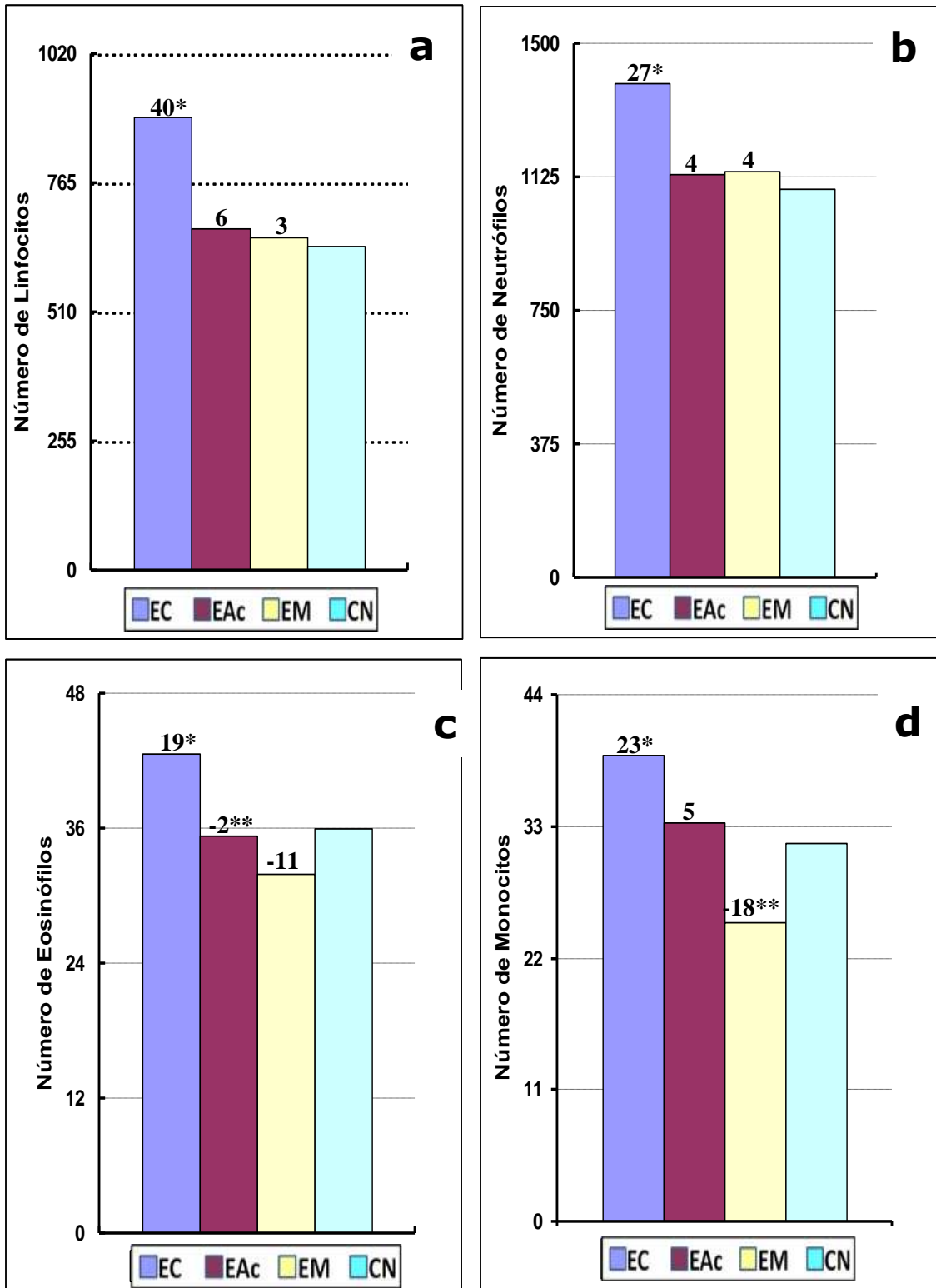


FIGURA 7. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de las 4 estirpes celulares de leucocitos de personas HIV + pertenecientes al estadio C con los tres extractos. a) Recuento de Linfocitos, b) Recuento de Neutrófilos, c) Recuento de Eosinófilos y d) Recuento de Monocitos . EC: Extracto clorofórmico, EA: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo.

* Porcentaje de incremento celular, ** Porcentaje de disminución celular (para ambos casos tomando como 100 % al número de células del control negativo).

TABLA 9. Significancia estadística* (p) del recuento de las células sanguíneas de personas HIV-1+ pertenecientes al estadio C para cada extracto.

TRATAMIENTO	NEUTRÓFILOS	EOSINÓFILOS	MONOCITOS	LINFOCITOS	LEUCOCITOS
EXTRACTO CLOROFÓRMICO	0.1544	0.4039	0.1745	0.0288	0.0809
EXTRACTO ACUOSO	0.8564	0.9341	0.8221	0.4282	0.4288
EXTRACTO METANÓLICO	0.8192	0.6450	0.1543	0.5250	0.4464

*Entre la media del control y la media del respectivo tratamiento.

El extracto acuoso sólo logró incrementar ligeramente ($p > 0.05$) el número de linfocitos, neutrófilos y monocitos (6, 4 y 5 %, Figura 7a, b y d). El extracto metanólico no logró incrementar ninguna estirpe celular, sino por el contrario ejerció un efecto inhibitorio, ya que se observó una disminución del número de células respecto al control para los eosinófilos y los monocitos, -11 y -18 % respectivamente (Figura 7c y d).

2 IDENTIFICACIÓN DE LA POBLACIÓN LINFOCITARIA T SOBRE LA CUAL ACTÚAN LOS EXTRACTOS

2.1 Cultivo de células sanguíneas de personas saludables

Las muestras utilizadas para este estudio fueron las mismas que se utilizaron para la determinación de la actividad de los tres extractos de *L. peruvianum* Ch. en el cultivo de células sanguíneas y procedieron de las mismas personas saludables. Los resultados del número de linfocitos en los cultivos de linfocitos de personas saludables con los tres extractos de *L. peruvianum* Ch. son presentados en la Tabla 10.

TABLA 10. Recuento de los Linfocitos T CD3⁺ y sus poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ para el cultivo de las células sanguíneas de personas saludables.

TRATAMIENTO	LINFOCITOS CD3+ (No Cel.± Desv.)	LINFOCITOS CD4+ (No Cel.± Desv.)	LINFOCITOS CD8+ (No Cel.± Desv.)
EXTRACTO CLOROFÓRMICO	1493 ± 97	1017 ± 84	656 ± 58
EXTRACTO ACUOSO	1264 ± 91	830 ± 69	560 ± 48
EXTRACTO METANÓLICO	1228 ± 80	798 ± 50	572 ± 58
CONTROL NEGATIVO	1042 ± 70	646 ± 43	496 ± 40

Los 3 extractos lograron incrementar el número de linfocitos T CD3⁺ respecto al control (Figura 8) pero sólo el extracto clorofórmico presentó diferencias significativas ($p=0.005$, Tabla 11). Para las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ los tres extractos incrementaron el número celular respecto al control (Figura 9), pero sólo el extracto clorofórmico presentó diferencias significativas para el número de linfocitos T CD3⁺CD4⁺ ($p=0.004$, Tabla 11) y CD3⁺CD8⁺ ($p=0.050$, Tabla 11).

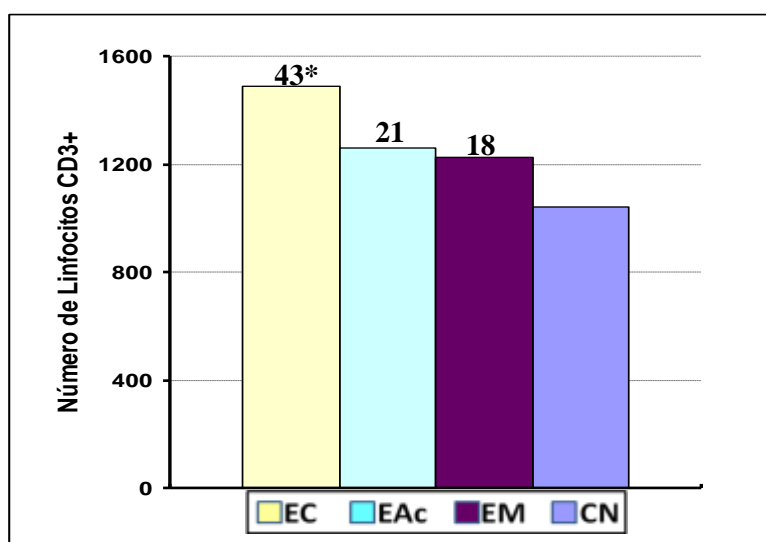


FIGURA 8. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de Linfocitos T CD3⁺ por citometría de flujo, de personas saludables. EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo. * Porcentaje de incremento celular (tomando como 100 % al número de células del control negativo).

TABLA 11. Significancia estadística* (p) del recuento de los Linfocitos T CD3⁺ y sus poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ de personas saludables.

TRATAMIENTO	LINFOCITOS CD3 ⁺	LINFOCITOS CD3 ⁺ CD4 ⁺	LINFOCITOS CD3 ⁺ CD8 ⁺
EC	0,005	0,004	0.050
EAc	0,088	0,054	0,341
EM	0,117	0,051	0,316

EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico, CN: Control negativo.

*Entre la media del control y la media del respectivo tratamiento.

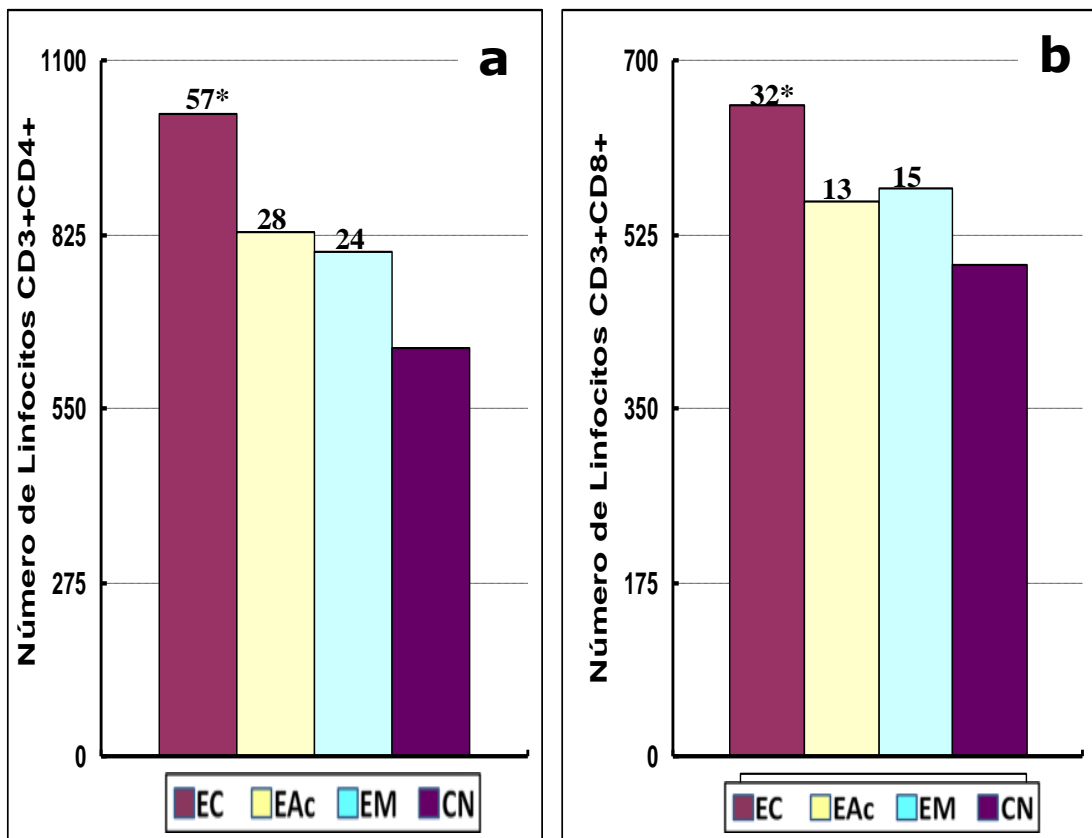


FIGURA 9. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de las subpoblaciones Linfocitarias T CD3⁺ por citometría de flujo, de personas saludables. a) Recuento de Linfocitos T CD3⁺CD4⁺ b) Recuento de Linfocitos T CD3⁺CD8⁺ EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo.

* Porcentaje de incremento celular (tomando como 100 % al número de células del control negativo).

2.2 Cultivo de células sanguíneas de personas HIV-1 ⁺

Los individuos utilizados para este estudio fueron los mismos utilizados para la determinación de la actividad de los tres extractos de *L. peruvianum* Ch. en el cultivo de células sanguíneas de personas HIV-1⁺.

a) Personas HIV-1⁺ Pertenecientes al Estadio B

Los resultados del número de linfocitos en los cultivos de las células sanguíneas de personas HIV-1⁺ pertenecientes al estadio B con los tres extractos de *L. peruvianum* Ch. son presentados en la Tabla 12.

TABLA 12. Recuento de los Linfocitos T CD3⁺ y sus poblaciones CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ para el cultivo de las células sanguíneas de personas HIV⁺ pertenecientes al estadio B.

INDIV.	TRATAMIENTO	LINFOCITOS CD3 ⁺ (No Cel.)	LINFOCITOS CD3 ⁺ CD4 ⁺ (No Cel.)	LINFOCITOS CD3 ⁺ CD8 ⁺ (No Cel.)
1	EC	1700	751	899
	EAc	1100	480	576
	EM	1000	440	527
	CN	1000	392	480
2	EC	1020	691	328
	EAc	810	516	258
	EM	815	538	264
	CN	700	453	234

EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico, CN: Control negativo.

En cuanto al número de linfocitos T CD3⁺, el extracto que presentó un mayor porcentaje de incremento celular respecto al control en ambos individuos fue el extracto clorofórmico (70 y 46 % para el individuo 1 y 2 respectivamente, Figura 10).

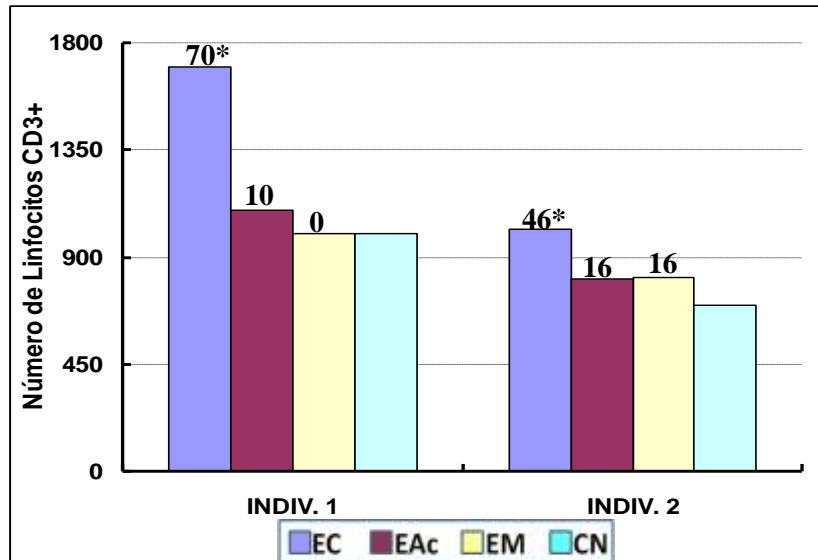


FIGURA 10. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de Linfocitos T CD3⁺ por Citometría de flujo, de personas HIV⁺ pertenecientes al estadio B. EC: Extracto clorofórmico, EA: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo.
* Porcentaje de incremento celular (tomando como 100 % al número de células del control negativo).

Para las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺, fue el extracto clorofórmico el que presentó un mayor porcentaje de incremento celular tanto para el número celular de linfocitos T CD3⁺ CD4⁺ como los CD3⁺CD8⁺ en ambos individuos (Figura 11).

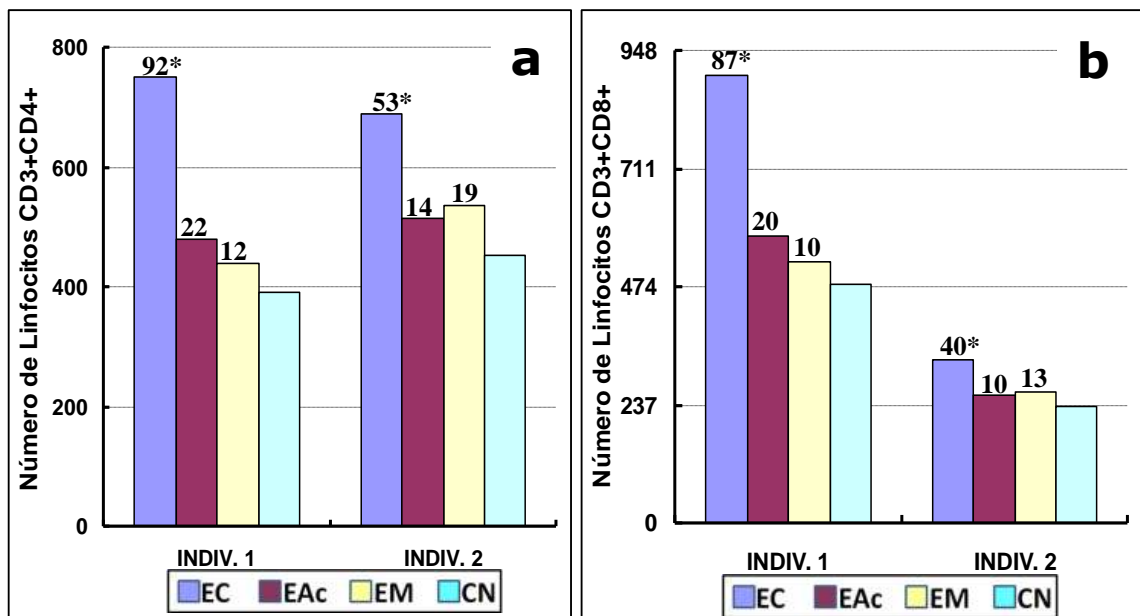


FIGURA 11. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de las subpoblaciones Linfocitarias T CD3⁺ por citometría de flujo, de personas HIV⁺ pertenecientes al estadio B. a) Recuento de Linfocitos T CD3⁺CD4⁺. b) Recuento de Linfocitos T CD3⁺CD8⁺. EC: Extracto clorofórmico, EA: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo.
* Porcentaje de incremento celular (tomando como 100 % al número de células del control negativo).

b) Personas HIV-1⁺ Pertenecientes al Estadio C

Los resultados del número de linfocitos en los cultivos de las células sanguíneas de personas HIV-1⁺ pertenecientes al estadio C con los tres extractos de *L. peruvianum* Ch. son presentados en la Tabla 13.

TABLA 13. Recuento de los Linfocitos T CD3⁺ y sus poblaciones CD3⁺ CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ para el cultivo de las células sanguíneas de personas HIV⁺ pertenecientes al estadio C.

TRATAMIENTO	LINFOCITOS CD3 ⁺ (No Cel.± Desv.)	LINFOCITOS CD3 ⁺ CD4 ⁺ (No Cel.± Desv.)	LINFOCITOS CD3 ⁺ CD8 ⁺ (No Cel.± Desv.)
EC	514 ± 119	53 ± 34	447 ± 101
EAc	410 ± 118	38 ± 29	353 ± 94
EM	391 ± 96	33 ± 27	337 ± 86
CN	382 ± 103	33 ± 27	323 ± 82

EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico, CN: Control negativo.

Al igual que los individuos pertenecientes al estadio B el extracto que obtuvo un mayor incremento del número de linfocitos T CD3⁺ fue el clorofórmico (35%, Figura 12), presentando el extracto acuoso y metanólico incrementos de 7 y 2 % respectivamente.

En cuanto a las subpoblaciones de linfocitos T CD3⁺ fue el extracto clorofórmico el que provocó un mayor incremento celular para ambas poblaciones: linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ (Figura 13), presentando diferencias significativas para la primera población ($p=0.0227$, Tabla 14); el extracto acuoso también logró incrementar las 2 subpoblaciones linfocitarias mientras que el extracto metanólico logró un incremento del 4% para la población linfocitaria CD3⁺CD8⁺, no se encontraron

diferencias significativas para estos 2 extractos en ninguna población linfocitaria estudiada.

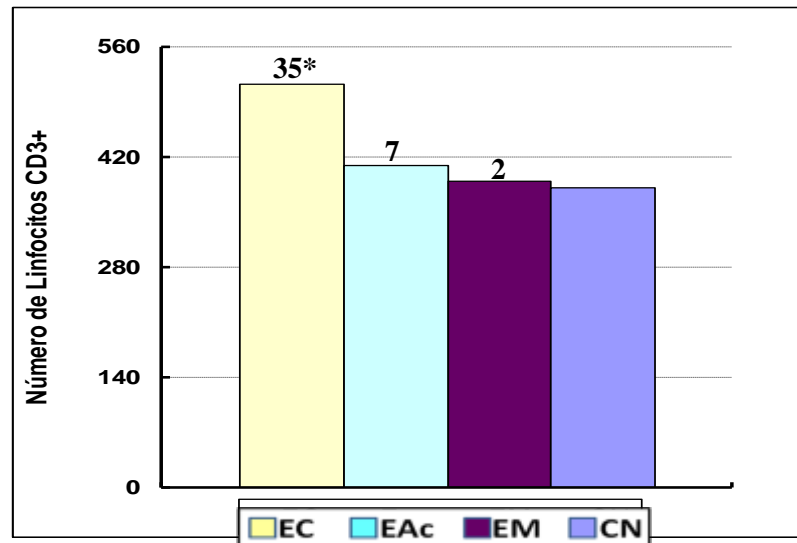


FIGURA 12. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de Linfocitos T CD3⁺ por citometría de flujo, de personas HIV⁺ pertenecientes al estadio C. EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo.

* Porcentaje de incremento celular (tomando como 100 % al número de células del control negativo).

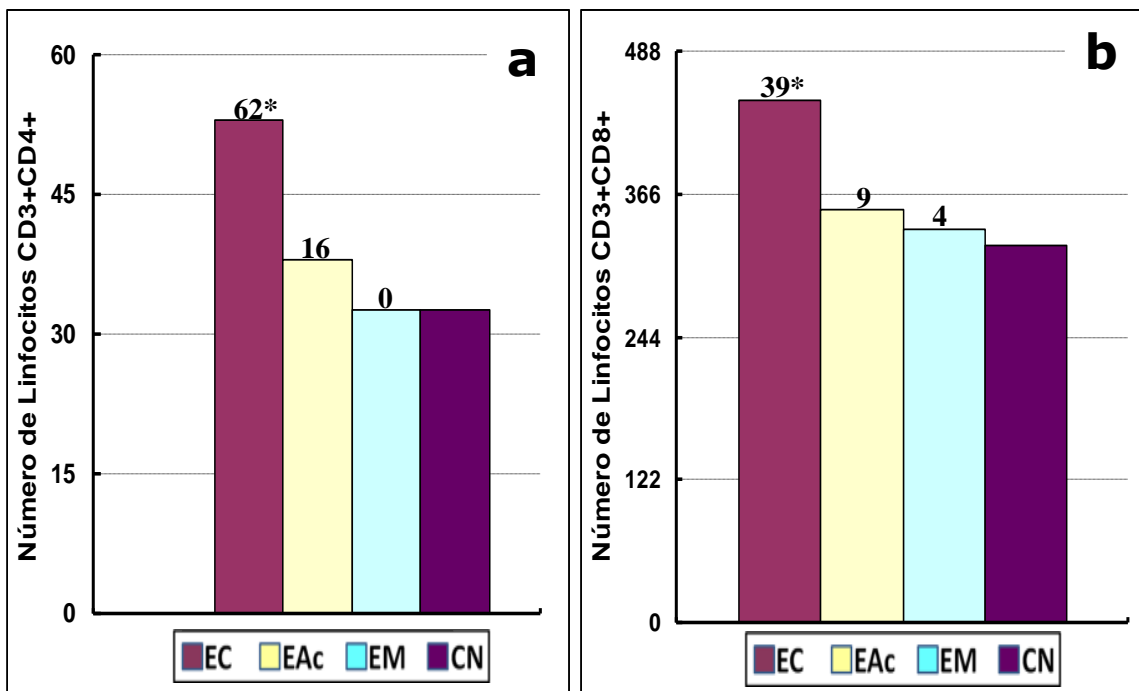


FIGURA 13. Efecto de los extractos de *L. peruvianum* Ch. sobre el recuento de las subpoblaciones Linfocitarias T CD3⁺ por citometría de flujo, de personas HIV⁺ pertenecientes al estadio C. a) Recuento de Linfocitos T CD3⁺CD4⁺ b) Recuento de Linfocitos T CD3⁺CD8⁺ EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico y CN: Control negativo.

* Porcentaje de incremento celular (tomando como 100 % al número de células del control negativo).

TABLA 14. Significancia estadística* (p) del recuento de los Linfocitos T CD3⁺ y sus poblaciones CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ de personas HIV⁺ pertenecientes al estadio C.

TRATAMIENTO	LINFOCITOS CD3 ⁺	LINFOCITOS CD3 ⁺ CD4 ⁺	LINFOCITOS CD3 ⁺ CD8 ⁺
EC	0.4478	0.0227	0.3926
EAc	0.8653	0.4732	0.8211
EM	0.9521	1	0.9116

EC: Extracto clorofórmico, EAc: Extracto acuoso, EM: Extracto metanólico, CN: Control negativo.

V. DISCUSIÓN

Lepidium peruvianum Ch. ha demostrado tener una gran variedad de propiedades medicinales tanto en el aspecto reproductivo (González *et al.*, 2006; González *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2005 y Ruiz *et al.*, 2005) como en el inmunológico siendo este último recientemente reconocido por los diversos trabajos realizados, donde se demuestra su capacidad para inhibir la formación de tumores (Alzamora, 2002) así como de contrarrestar el efecto de agentes inmunosupresores como la ciclofosfamida (Alzamora *et al.*, 2004), estas propiedades son atribuidas principalmente a los metabolitos secundarios que produce tales como alcaloides, flavonoides, glucosinolatos entre otros (Yllescas, 1994; González *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se reporta la actividad sobre el incremento celular de tres tipos de extractos de *L. peruvianum* Ch. tanto en células de personas inmunocompetentes (personas saludables) como inmunosuprimidas (HIV⁺).

El perfil fitoquímico realizado a los tres extractos permitió identificar la presencia de saponinas, alcaloides y flavonoides, la presencia de estos metabolitos secundarios también ha sido reportada por otros autores (Yllescas, 1994; González *et al.*, 2006).

Para las personas saludables, los tres extractos lograron incrementar el número de leucocitos respecto al control, siendo el extracto clorofórmico el que presentó un mayor incremento. En cuanto a las 4 estirpes celulares evaluadas, el incremento celular del número de linfocitos logró obtener diferencias significativas con el extracto clorofórmico; este extracto presentó una fuerte presencia de alcaloides. La capacidad inmunoestimulante de los alcaloides de plantas ha sido ampliamente reportada; así por ejemplo, en la uña de gato, se sabe que sus propiedades como la

linfoproliferación y el incremento de la fagocitosis se deben a la presencia de sus alcaloides oxindólicos pentacíclicos: isomitrafalina y pteropodina (Wurm *et al.*, 1998).

La función de ingestión y destrucción de los microorganismos está mediada por los fagocitos, es decir, los neutrófilos en las primeras fases de las respuestas inmunitarias y los macrófagos en las fases tardías de las mismas (Abbas, 2002). En el presente trabajo, los neutrófilos lograron ser incrementados por el extracto alcaloidal, pudiéndose plantear un posible efecto de activación o estimulación, el efecto de los alcaloides también ha sido reportado en los procesos de la fagocitosis incrementando su actividad (Lemaire *et al.*, 1999 y Wagner *et al.*, 1985).

El otro extracto que también logró un incremento celular fue el extracto acuoso, en el perfil fitoquímico de este extracto se pudo demostrar la presencia principalmente de saponinas y en baja concentración flavonoides y alcaloides. Las saponinas provenientes de extractos de plantas son conocidas por presentar propiedades inmunoestimulantes (Brush, *et al.*, 2006), podría plantearse entonces que para este extracto, son las saponinas más que los alcaloides las que podrían conferir la capacidad de incremento celular y muy probablemente de inmunoestimulación; sin embargo, es necesario realizar estudios mas detallados para corroborar esta hipótesis.

La infección con el virus de la inmunodeficiencia humana produce disturbios funcionales profundos en las células del sistema inmune durante el curso de la infección, debilitando la función inmunológica, de manera tal que las personas que la padecen son blancos de diversas enfermedades oportunistas. Un posible mecanismo del por qué el HIV le confiere a los linfocitos una función defectuosa, tendría relación con una proteína llamada Tat (por transactivador) que interviene en la regulación de los procesos de la replicación viral del HIV; esta proteína desempeñaría algún papel en la patogenia de la inmunodeficiencia por el HIV en los linfocitos T, interaccionando

con diversas proteínas reguladoras de los linfocitos T, interfiriendo en el funcionamiento normal de éstas.

El cultivo de las células sanguíneas de los individuos HIV-1⁺ con los extractos de *L. peruvianum* Ch. nos permitió demostrar su potencial efecto estimulador en el sistema inmune en personas inmunosuprimidas HIV-1⁺. Al igual que en las personas saludables, el extracto que presentó un mayor efecto estimulador fue el extracto clorofórmico, el cual logró incrementar el número de leucocitos pero principalmente de la estirpe celular linfocitaria.

El recuento celular de los eosinófilos y monocitos para los individuos HIV-1⁺ pertenecientes al estadio B y C presentó una disminución respecto al control en el extracto metanólico, en este extracto se pudo detectar la presencia de los tres metabolitos secundarios evaluados en esta tesis, pero en base a las referencias bibliográficas consultadas se puede plantear que esta disminución de la replicación se podría deber a los flavonoides que han demostrado tener propiedades inhibitorias de la replicación celular (Brochado *et al.*, 2003) y antivirales específicamente sobre el HIV (Nair *et al.*, 2002). La primera propiedad de los flavonoides podría sustentarse en el hecho que el extracto metanólico presentó una menor estimulación de los leucocitos y sus estirpes celulares tanto en las personas saludables como HIV⁺.

En cuanto a las poblaciones linfocitarias T para las personas saludables se pudo comprobar que los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ conocidos como cooperadores, fueron los que presentaron una mayor estimulación tanto por el extracto clorofórmico como por el extracto acuoso. Las propiedades de los alcaloides estimulando la linfoproliferación ya han sido mencionadas, y el significativo incremento celular respecto al control negativo de los linfocitos del extracto clorofórmico podría dar una evidencia de esta propiedad. En cuanto al extracto acuoso la presencia de alcaloides

fue muy débil, sin embargo este presentó una alta positividad en las pruebas para la detección de saponinas, las propiedades de las saponinas estimulando las células del sistema inmune han sido reportadas para otros extractos de plantas (Brush, *et al.*, 2006), por lo que los resultados obtenidos por el extracto acuoso podrían ser debido en parte a la presencia de saponinas.

Sólo el extracto clorofórmico fue capaz de causar diferencias significativas sobre el número de linfocitos T CD8⁺ en las personas saludables. Una de las funciones de los linfocitos T cooperadores CD4⁺ es activar o estimular a los linfocitos T CD8; el número de linfocitos T CD4⁺ mostró un mayor incremento con el extracto clorofórmico y éstos a su vez podrían haber participado en los procesos de estimulación y como consecuencia la proliferación de los linfocitos T CD8⁺. Los linfocitos T CD8⁺ también podrían haber sido estimulados por algún constituyente del extracto.

El perfil de estimulación de los individuos HIV-1⁺ perteneciente al estadio B o asintomático fue similar al de los individuos normales. El extracto clorofórmico logró una mayor estimulación de los linfocitos CD3⁺ y de sus poblaciones linfocitarias CD4⁺ y CD8⁺. Estas propiedades de linfoproliferación también podrían deberse a los alcaloides presentes en el extracto.

En cuanto a los individuos pertenecientes al estadio C ó SIDA también pudo observarse un incremento del número de linfocitos, siendo los linfocitos T CD4⁺ estimulados por el extracto clorofórmico; los individuos pertenecientes al estadio final o SIDA presentan una fuerte inmunosupresión, debido en gran parte a la disminución del número de linfocitos T CD4⁺. En los resultados de los individuos pertenecientes al estadio final o SIDA se pudo obtener un aumento del 62% del número de células CD4⁺ respecto al control; esto podría ser planteado en parte a la falta de proliferación de los linfocitos y a un aumento en la supervivencia de los linfocitos T como resultado

de la inhibición de la replicación del HIV, que podría ocurrir por constituyentes de los extractos como los flavonoides. Los flavonoides han demostrado tener propiedades antivirales específicamente sobre el HIV (Young *et al.*, 2007).

Las propiedades inmunoestimulantes de *L. peruvianum* Ch. determinadas en el presente estudio podrían sentar las bases para utilizar esta planta como tratamiento de las personas que padecen el HIV a fin de restaurar el nivel y funcionamiento de su sistema inmune, que unido a su capacidad energizante y revitalizante la colocarían como un excelente agente para ser utilizado en una terapia alternativa o como adyuvante del tratamiento que actualmente reciben las personas HIV⁺.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto que produjo el incremento significativo del número de leucocitos, procedentes tanto de personas inmunocompetentes (personas saludables) como de las inmunosuprimidas (HIV-1⁺) fue el clorofórmico.
2. El extracto que causó un incremento significativo del número de linfocitos, procedentes de personas inmunocompetentes (personas saludables) como de las inmunosuprimidas (HIV-1⁺) fue el clorofórmico.
3. El extracto clorofórmico de *Lepidium peruvianum* Ch. a una concentración de 800 µg/mL provocó el incremento de los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ en las personas saludables.
4. El extracto clorofórmico de *Lepidium peruvianum* Ch. a una concentración de 800 µg/mL provocó el incremento de los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ en las personas HIV-1⁺ pertenecientes al estadio C.
5. Los extractos acuoso y metanólico no lograron producir un incremento significativo del número de leucocitos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos y monocitos, ni de los linfocitos T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ tanto de personas inmunocompetentes (personas saludables) como de las inmunosuprimidas (HIV-1⁺).

VII. RECOMENDACIONES

1. Identificar el principio activo en cada uno de los extractos responsable de la actividad encontrada sobre las células evaluadas en este estudio.
2. Realizar el estudio *in vivo* en individuos HIV⁺ y personas saludables para así corroborar los resultados obtenidos.
3. Efectuar estudios en el extracto clorofórmico acerca de la capacidad de inmunoestimulación, mediante la producción de interleuquinas; así como del mecanismo molecular que se relaciona con el principio activo del extracto.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Abul; LICHTMAN, Andrew and POBER, Jordan. *Inmunología Celular y Molecular*. 3era ed. España: Mc Graw Hill-Interamericana. 2002. 577 p. ISBN. 0-7216-8233-2
- ADHVARYU, Meghna; REDDY, Narsimha and PARABIA, Minoo. Effects of Four Indian Medicinal Herbs on Isoniazid-, Rifampicin- and Pyrazinamide-Induced Hepatic Injury and Immunosuppression in Guinea Pigs. *World J Gastroenterol*. 2007, vol.13, n°23, p. 3199-205.
- AKBAY, Pinar; BASARAN, Ahmet; UNDEGER, Ulkii and BASARAN, Nursen. *In vitro* Immunomodulatory Activity of Flavonoid Glycosides from *Urtica dioica* L. *Phytother Res*. 2003, vol. 17, n° 1, p. 34-7.
- ÁLVAREZ SALAZAR, Evelyn Katy. "Estudio Comparativo de la Actividad Moduladora del Extracto Metanólico de Cuatro Ecotipos de *Lepidium peruvianum* Chacón (Maca) Sobre la Respuesta Inmune Humoral y Celular en Ratones". Asesor: Libertad Alzamora. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima, 2008.
- ALZAMORA GONZÁLES, Libertad. 2002. "Estudio de Efecto Antitumoral e Inmunomodulador del Extracto Alcaloidal de Raíces de *Lepidium peruvianum* chacón "Maca" (Brassicaceae), en Ratones". Asesor: Álvaro Marcelo. Tesis Doctoral, UNMSM, EAP Ciencias Biológicas. Lima, 2002.
- ALZAMORA, L.; ÁVILA, G.; GARCIA, J.; COLONA, E. y ALZAMORA, D. "Inmunoestimulación con Extracto Acuoso de *Lepidium peruvianum* (Maca) en Ratones Inmunosuprimidos con Ciclofosfamida". En XIII Reunión Científica ICBAR. Lima, Perú, 14-16 abril 2004.
- ALZAMORA, Libertad.; GALVÁN. Patricia; ÁLVAREZ, Evelyn; TORRES, Dina; COLONA, Erasmo; ALIAGA, Madeley y MARCELO, Alvaro. Producción de IFN- γ en Cultivos de Linfocitos Humanos por Efecto de los Extractos Metanólicos

de Cuatro Ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Brassicaceae). Rev. Per. Biol. 2007, vol.13, n° 3, p. 207 – 209.

- APABLAZA, G.; DIAZ, M.; SAN MARTÍN, R. y MOYA, E. Control de Oidio de las Cucurbitaceas con Saponinas Presentes en Extractos de Quillay (*Quillaja saponaria*). Cien. Inv. Agr. 2002, vol. 29, n° 2, p. 83-90.
- BREYTENBACH, Ulrike; CLARK, Anel; LAMPRECHT, Jahan and BOUIC, Patrick. Flow Cytometric Analysis of the Th1-Th2 Balance in Healthy Individuals and Patients Infected with the Human Immunodeficiency Virus (HIV) Receiving a Plant Sterol/Sterolin Mixture. Cell Biol Int. 2001, vol. 25, n° 1, p. 43-9.
- BOCCHIERI, Maureen; TALLE, Mary; MALTESE, Lisa; RAGUCCI, Italia; HWANG, Chin-Chang and GOLDSTEIN, Gideon. Whole Blood Culture for Measuring Mitogen Induced T Cell Proliferation Provides Superior Correlations with Disease State and T Cell Phenotype in Asymptomatic HIV-Infected Subjects. Journal of Immunological Methods. 1995, vol.181, p. 233-243.
- BOT, Y.; MGBOJIKWE, L.; CHIKA, N.; ALASH'LE, A.; JELPE, D. and DEMAS, D. Screening of the Fruit Pulp Extract of *Momordica balsamina* for Anti HIV Property. African Journal of Biotechnology. 2007, vol. 6, n° 1, p. 47-52.
- BROCHADO, Claudia; ALMEIDA, Ana; BARRETO, Beatriz; COSTA, Leandro; RIBEIRO, Luciene; PEREIRA, Rachel; KOATZ, Vera. & COSTA, Sonia. Flavonol Robinobiosides and Rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their Effects on Lymphocyte Proliferation in vitro. J. Braz. Chem. Soc. 2003, vol. 14, n° 3, p. 449-451.
- BRUNETON, Jean. *Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas Medicinales*. 2da ed. Zaragoza: Editorial Acribia. 2001. 1120 p. ISBN. 8420009563
- BRUSH, Julie; MENDENHALL, Elissa; GUGGENHEIM, Alena & CHAN, Tracy. The Effect of *Echinacea purpurea*, *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza*

glabra on CD69 Expression and Immune Cell Activation in Humans. *Phytotherapy Research*. 2006, vol. 20, n° 8, p. 687–695.

- CHACÓN, Gloria. “Estudio Fitoquímico de *Lepidium meyenii* Walp” Tesis de Bachiller, UNMSM, EAP Ciencias Biológicas. Lima. 1961.
- CHACÓN, Gloria. La maca (*Lepidium peruvianum* Chacón sp. nov.) y su hábitat. *Rev. Per. Biol.* 1990, Vol. 3, n° 2, p. 169-272.
- CHACÓN, Gloria. La Importancia de *Lepidium peruvianum* (“Maca”) en la Alimentación y Salud del Ser Humano y Animal 2,000 Años Antes y Después de Cristo y en el Siglo XXI. Lima: Servicios Gráficos “Romero”. 1997.
- CHEN, Min; KILGORE, Nicole; LEE, Kuo-Hsrung and CHEN, Dao-Feng. Rubrisandrins A and B, Lignans and Related Anti-HIV Compounds from *Schisandra rubriflora*. *J. Nat. Prod.* 2006, vol. 69, n° 12, p. 1697–1701.
- CHUNG, Francisco; RUBIO, Julio; GONZALES, Carla and GASCO, Manuel Dose–Response Effects of *Lepidium meyenii* (Maca) Aqueous Extract on Testicular Function and Weight of Different Organs in Adult Rats Francisco. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005, vol. 98, n° 1-2, p. 143–147.
- CIKUTOVIC, Marcos y CIKUTOVIC, Pablo. Plantas Altoandinas y su Efecto Sobre la Fertilidad: ¿Mito o Realidad? *Ciencia y Trabajo*. 2005, vol. 7, n° 16, p. 41-48.
- COS, Paul; MAES, Louis; BERGHE Dirk.; HERMANS, Nina; PIETERS, Luc and VLIETINCK, Arnold. Plant Substances as Anti-HIV Agents Selected According to Their Putative Mechanism of Action. *J. Nat. Prod.* 2004, vol. 67, n° 2, p. 284–293.
- CRONQUIST, Arthur. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press, 1981. 1262 p. ISBN 0-231-03880-1
- CUENTAS, Rosa; DE LA CRUZ, L.; HERNÁNDEZ, G.; MATEO, I.; CASTAÑEDA, Benjamin.; IBÁÑEZ, Lucy y RAMOS, Eva. Evaluación del Efecto Antioxidante de

Hojas de *Lepidium peruvianum* Chacón, "MACA". Revista Horizonte Médico. 2008, vol. 8, n° 1, p. 46-55.

- DINI, A.; MIGLIUOLO, G.; RASTRELLI, L.; SATURNINO, P. and SCHETTINO O. Chemical Composition of *L. Meyenii*. Food Chemistry. 1994, vol. 49, p. 347 – 349.
- FIDAN, Isil; OZKAN, Semiha; GURBUZ, Ilhan; YESILYURT, Emine; ERDAL, Berna; YOLBAKAN, Sultan and IMIR, Turgut. The Efficiency of *Viscum album* ssp. Album and *Hypericum perforatum* on Human Immune Cells *in vitro*. Immunopharmacol Immunotoxicol. 2008, vol. 30, n° 3, p. 519-28.
- FLETCHER, M.; URBAN, D.; ASTHANA, J.; WALLING, A. and PAGE, J. 1997. Lymphocyte Proliferation, pag. 313–319. En Rose, N.; Conway de Macarico, E.; Folds, J.; Lane, H.; and Nakamura, R. (ed.), Manual of clinical laboratory immunology, 5th ed. ASM Press, Washington, D.C.
- FRANCO-MOLINA, M.; GÓMEZ-FLORES, R.; TAMEZ-GUERRA, P.; TAMEZ-GUERRA, R.; CASTILLO-LEON, L. and RODRÍGUEZ-PADILLA, C. *In vitro* Immunopotentiating Properties and Tumour Cell Toxicity Induced by *Lophophora williamsii* (peyote) Cactus Methanolic Extract. Phytotherapy Research. 2003, vol.17, n° 9, p. 1076 – 1081.
- GAINES, Hans; ANDERSON, Lena and BIBERFELD, Gunnei. A New Method for Measuring Lymphoproliferation at the Single-Cell Level in Whole Blood Cultives by Flow Cytometry. J. Immunol. Methods. 1996, vol.195, p. 63-72.
- GANZERA, Markus; ZHAO, Jianping; MUHAMMAD, Ilias and KHAN, Ahmad. Chemical Profiling and Standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. Chem. Pharm. Bull. 2002, vol. 50, n° 7, p. 988-91.
- GARRÓ, Virginia. Macro y Microelementos de la Maca. Mimeo, Lima. Perú. 1999.
- GOLDSBY, Richard; KINDT, Thomas; OSBORNE, Barbara y KUBI, Janis. *Inmunología*. 5ta ed. México: Mc Graw Hill, 2004. 665 p. ISBN: 9701047109

- GONZÁLES, G.; GASCO, M.; CÓRDOVA, A. CHENG, A.; RUBIO, J. and VILLEGAS, L. Effect of *Lepidium meyenii* (Maca) on Spermatogenesis in Male Rats Acutely Exposed to High Altitude (4340 m). *Journal of Endocrinology*. 2004, vol. 180, (citado 20-01-2010) p. 87–95. Disponible en <<http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/reprint/180/1/87.pdf>>
- GONZÁLES, Carla; RUBIO, Julio; GASCO, Manuel NIETO, Jessica; YUCRA, Sandra and GONZÁLES, Gustavo. Effect of Short-Term and Long-Term Treatments with Three Ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on Spermatogenesis in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006, vol. 103, n° 3, p. 225–229.
- HANNET, I.; ERKELLER-YUKSEL, F.; LYDYARD, P.; DENEYS, V. and DEBRUYERE, M. Developmental and Maturational Changes in Human Blood Lymphocyte Subpopulations. *Immunology Today*. 1992, vol. 13, n° 6, p. 215-218.
- HARIDAS, Valsala; HIGUCHI, Masahiro; JAYATILAKE, Gamini; BAILEY, David; MUJOO, Kalpana and BLAKE, Mary. Avicins: Triterpenoid Saponins from *Acacia victoriae* (Bentham) Induce Apoptosis by Mitochondrial Perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001, vol. 98, n° 10, p. 5821-26.
- HAYAKAWA, Y.; FUJII, H.; HASE, K.; OHNISHI, Y.; SAKUKAWA, R.; KADOTA, S.; NAMBA, T. and SAIKI, I. Anti-Metastatic and Immunomodulating Properties of the Water Extract from *Celosia argentea* Seeds. *Biol Pharm Bull*. 1998, vol. 21, n° 11, [citado 10-03-2010] p. 1154-9. Disponible en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9853404>>
- HERTOOG, Michael, HOLLMAN, Peter, and KATAN, Martijn. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem*. 1992, vol. 40, p. 2379-2383.
- HOPKINS, Williams and HÖNER, Norman. *Introducción to Plant Physiology*. 3rd ed. New York: John Wiley y Sons, 2004. 560 p. ISBN 0471389153

- HORIUCH, Masafumi; MURAKAMI, Chihiro; FUKAMIYA, Narihiko; YU, Donglei; CHEN, Tzu-Hsuan; BASTOW, Kenneth.; ZHANG, De-Cheng; TAKAISHI, Yoshihisa.; IMAKURA, Yasuhiro and LEE, Kuo-Hsiung. Tripterfordines A–C, Sesquiterpene Pyridine Alkaloids from *Tripterygium wilfordii*, and Structure Anti-HIV Activity Relationships of Tripterygium Alkaloids. *J. Nat. Prod.* 2006, vol. 69, n° 9, p. 1271–1274.
- Hostettmann, K. & Marston, A. *Chemistry and Pharmacology of Natural Products: Saponins*. 1era ed. New York: Cambridge University Press, 1995. 560 p. ISBN: 0521329701
- JANEWAY, Charles; TRAVERS, Paul; WALPORT, Mark y SHLOMCHIK, Mark. *Immunobiología*. 4ta ed. Barcelona: Masson S.A., 2003. 600 p. ISBN: 081533642X
- KIKUCHI, Yoshihiro; SASA, Hidenori.; KITA, Tsunekazu; HIRATA, Junko; TODE, Takehiko; and NAGATA, Ichiro. Inhibition of Human Ovarian Cancer Cell Proliferation *in vitro* by Ginsenoside Rh2 and Adjuvant Effects to Cisplatin *in vivo*. *Anticancer Drugs*. 1991, vol. 2, n° 1, p. 63-67.
- KIRSZBERG, Clarice; ESQUENAZI, Daniele; CELUTA, Alviano and RUMJANEK, Vivian. The Effect of a Catechin-rich Extract of *Cocos nucifera* on Lymphocytes Proliferation. *Phytother. Res.* 2003, vol. 17, p.1054-1058.
- KLEIN, Setefan; DOBMEYER, Jürgen; DOBMEYER, Thomas; PAPE, Martine; OTTMANN, Oliver; HELM, Eilke; HOELZER, Dieter and ROSSOL, Rita. Demonstration of the Th1 to Th2 Cytokine Shift During the Course of HIV-1 Infection Using Cytoplasmic Cytokine Detection on Single Cell Level by Flow Cytometry. *AIDS*. 1997, vol. 11, n° 9, p. 1111-8.
- KRISHNASWAMY, K. and RAGHURAMULU, N. Bioactive Phytochemicals with Emphasis on Dietary Practices. *Indian J Med Res.*; 1998, vol. 108, p. 167-81.

- LEE, Eui-joon; KO, Eunjung; LEE, Jinwoo; RHO, Samwoong; KO, Seonggyu; SHIN, Min-Kyu; MIN, Byung-il; HONG, Moo-Chang; KIM, Si-young and BAE, Hyunsu. Ginsenoside Rg1 Enhances CD4(+) T-Cell Activities and Modulates Th1/Th2 Differentiation. *Int Immunopharmacol.* 2004, vol. 4, n° 2, p. 235-44.
- LEMAIRE, Irma; ASSINEWE, Valerie; CANO, Pablo; AWANG, Dennis and ARNASON, Thor. Stimulation of Interleukin-1 and -6 Production in Alveolar Macrophages by the Neotropical Liana, *Uncaria tomentosa* (uña de gato). *J Ethnopharmacol.* 1999, vol. 64, p. 109-15.
- LIN, Rui-Chao; HANQUET, Bernard. and LACAILLE-DUBOIS, Marie-Aleth. Aferoside A, a Steroidal Saponin from *Costus afer*. *Phytochemistry.* 1996, vol. 43, n° 3, p. 665-68.
- LIM, Lony; FIORDALISI, Michelle; MANTELL, Janet ; SCHMITZ, John and FOLDS, James. A Whole-Blood Assay for Qualitative and Semiquantitative Measurements of CD69 Surface Expression on CD4 and CD8 T Lymphocytes Using Flow Cytometry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1998, vol. 5, [Citado 12-11-2009] p. 392–398. Disponible en < <http://cdli.asm.org/cgi/reprint/5/3/392>>
- LOCK, Olga. *Investigación Fitoquímica.* 2da ed. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú, 1994. 350 p.
- LYU, S. and PARK, W. Effects of Korean Mistletoe Lectin (*Viscum album coloratum*) on Proliferation and Cytokine Expression in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and T-Lymphocytes. *Arch Pharm Res.* 2007, vol. 30, n° 10, p. 1252-64.
- MARTÍNEZ-FLORES, S.; GONZÁLES-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J and MUÑÓN, J. Los Flavonoides: Propiedades y Acciones Antioxidantes. *Nutr. Hosp.* 2002, vol. 6, [citado 04-08-2009] p. 271-278. Disponible en < <http://www.nutricionhospitalaria.com/mostrarfle.asp?ID=3338>>

- NAIR, Madhavan; KANDASWAMI, Chithan; MAHAJAN, Supriya; NAIR, Harikrishna; CHAWDA, Ram; SANAN, Thomas and SCHWARTZ, Stanley. Grape Seed Extract Proanthocyanidins Downregulate HIV- 1 Entry Coreceptors, CCR2b, CCR3 and CCR5 Gene Expression by Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Biol. Res.* 2002, vol. 35, n° 3-4, p. 421-431.
- OLSSON, L.; VEIT, M.; WEISSENBOCK, G. and BORNMAN, J. Differential Flavonoid Response to Enhanced UV-B Radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry*. 1998, vol. 49, n° 4, p. 1021-1028.
- ONUSIDA. *Informe sobre la epidemia mundial de SIDA*. Programa Conjunto de las Naciones Unidas Sobre el VIH/SIDA. 2008 [citado 10-04-2009] 360 p. Disponible en <http://www.unaids.org/es/KnowledgeCentre/HIVData/GlobalReport/2008/2008_Global_report.asp>. ISBN 978 92 9 173713 0
- PARNES Jane. T-Cell Differentiation Antigens: Proteins, Genes and Function. *BioEssays*. 1987, vol. 4, n° 6, p. 255-9.
- PONCE, David. “Estimación de Parámetros Genéticos para Once Caracteres en una Población de Maca (*Lepidium meyenii* Walp) de fase generativa (Producción de Semilla)”. En 3er Congreso Peruano de Genética. Lima, Perú, 11-15 Dic 1995.
- PUGH, Nirmal; ROSS, Samir; ELSOHLI, Mahmoud and PASCO, David. Characterization of Aloeride, a New High-Molecular-Weight Polysaccharide from *Aloe vera* with Potent Immunostimulatory Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2001, vol. 49, n° 2, p. 1030–1034.
- QUIRÓS, C. and ALIAGA, R. Maca *Lepidium meyenii* Walpers. En: HERMANN, M. AND HELLER, J (edit). *Andean Roots and Tubers: Ahipha, Arracacha, Maca and Yacón. Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops*. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1997, 173-87 p. ISBN 92-9043-351-5

- QUIRÓS, C. Genética de la Maca y Especies Relacionadas. Curso Taller Internacional sobre Maca. Universidad Nacional Agraria La Molina. 1999. Lima-Perú.
- REYES, Erick; SYVITSKI, Raymond; JAROSLAV, Kralovec; NOSEDA, Miguel; BARROW, Colin; EWART, Stephen; LUMSDEN, Michael and GRINDLEY, Bruce. Immunostimulatory Polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. A New Galactofuranan. Measurement of Molecular Weight and Molecular Weight Dispersion by DOSY NMR. *Biomacromolecules*. 2006, vol. 7, n° 8, p. 2368–2376.
- ROSAS, P. y PINO, F. 2004. Efecto Antioxidante de *Lepidium peruvianum*, Chacón sp. (“Maca”) *in vitro*. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, Facultad de farmacia y Bioquímica. Universidad Católica Santa Maria. Arequipa.
- RUIZ-LUNA, Ana; SALAZAR, Stephanie; ASPAJO, Norma; RUBIO, Julio; GASCO, Manuel and GONZALES, Gustavo. *Lepidium meyenii* (Maca) Increases Litter (camada) Size in Normal Adult Female Mice. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005, vol. 3, n° 16, p. 1-6.
- SHIBATA, SHOJI. Chemistry and Cancer Preventing Activities of Ginseng Saponins and Some Related Triterpenoid Compounds. *J Korean Med SCI*. 2001, VOL. 16 (suppl), p. S28-37.
- STEIN, G.; EDLUND, U.; PFÜLLER, U.; BÜSSING, A. and SCHIETZEL, M. Influence of Polysaccharides from *Viscum album* L. on Human Lymphocytes, Monocytes and Granulocytes *in vitro*. *Anticancer Res*. 1999, vol. 19, n° 5B, p. 3907-14.
- STAVRIC Bozidar. Role of Chemopreventers in Human Diet. *Clin Biochem*. 1994, vol. 27, n° 5, p. 319-32.
- TAKADA, Kentaro; BERMINGHAM, Alun; KEEFE, Barry; WAMIRU, Antony; BEUTLER, John; Le GRICE, Stuart; LLOYD, John. GUSTAFSON, Kirk. and MCMAHON, James. An HIV RNase H Inhibitory 1,3,4,5-Tetragalloylapiitol from

the African Plant *Hylodendron gabunensis*. J. Nat. Prod. 2007, vol. 70, n° 10, p.1647–1649.

- TELLO, J.; HERMAN, M. y CALDERÓN, A. La Maca (*Lepidium meyenii* Walp); Cultivo Alimenticio Potencial para las Zonas Altoandinas. Boletín de Lima. 1992, vol. 81, p.56 – 66.
- TORRES GONZÁLES, Dina. “Efecto Modulador de la Respuesta Inmune Humoral de Extractos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (Maca) en Ratones Inmunosuprimidos con Ciclofosfamida”. Asesor: Libertad Alzamora. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Ciencias Biológicas, Lima. 2008.
- VALENTOVÁ, Katerina. and ULRICHOVÁ, Jitka. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* –Prospective Andean Crops for the Prevention of Chronic Diseases. Biomed. Papers. 2003, vol. 147, n° 2, p. 119–130.
- VERPOORTE, Rob. Exploration of Nature’s Chemodiversity: the of Secondary Metabolites as Leads in Drug Develoment. Drug Develop Trends. 1998, vol. 3, p. 232-238.
- VERPOORTE, Rob. Pharmacognosy in the New Millennium: Leadfinding and Biotechnology. J. Pham Pharmacol. 2000, vol. 52, p. 253-262.
- WAGNER, H.; KREUTZKAMP, B. and JURCIC, K. The Alkaloids of *Uncaria tomentosa* and Their Phagocytosis Increasing Effects. Planta Medica, 1985, vol. 51, p. 419-423.
- WANG, Yan-yi and ZHENG, Xiao-Xiang. A Flow Cytometry-Based Assay for Quantitative Analysis of Cellular Proliferation and Cytotoxicity *in vitro*. Journal of Immunological Methods. 2002, vol. 268, p. 179– 188.
- WILLIAMS, James. Review of Antiviral and Immunomodulating Properties of Plants of the Peruvian Rainforest with a Particular Emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. Altern Med Rev. 2001, vol. 6, n° 6, p. 567-579.

- WURM, M.; KACANI, L., LAUS, G.; KEPLINGER, K. and DIERICH M. Pentacyclic Oxindole Alkaloids from *Uncaria tomentosa* Induce Human Endothelial Cells to Release a Lymphocyte Proliferation-Regulating Factor. *Planta Med.* 1998, vol. 64, n° 8, p.701-4.
- YESILADA, Erdem; BEDIR, Erdal; CALIŞ, İlhan; TAKAISHI, Yoshihisa. and OHMOTO Yasukazu. Effects of Triterpene Saponins from *Astragalus* Species on *in vitro* Cytokine Release. *J Ethnopharmacol.* 2005, vol. 96, n° 1-2, p. 71-7.
- Yllescas, L. “Estudio Químico y Fitoquímico Comparativo de 3 Ecotipos de *Lepidium meyenii* Walp “Maca” Procedente de Carhuamayo (Junín)”. Tesis Título Profesional. UNMSM, FAC. Farmacia y Bioquímica, Lima, 1994.
- YU, Young-Beob; MIYASHIRO, Hirotsugu; NAKAMURA, Norio; HATTORI, Masao. and PARK, Jong. Effects of Triterpenoids and Flavonoids Isolated from *Alnus firma* on HIV-1 Viral Enzymes. *Arch Pharm Res.* 2007, vol. 30, n° 7, p. 820-826.
- YOUNG-BEOB, Yu; MIYASHIRO, Hirotsugu; NAKAMURA, Norio; HATTORI, Masao and CHEOL, Jong. Effects of Triterpenoids and Flavonoids Isolated from *Alnus firma* on HIV-1 Viral Enzymes. *Arch Pharm Res.* 2007, Vol. 30, n° 7, p. 820-826.
- ZHU, Jin; TAKESHITA, Tatsuya; KITAGAWA, Isao; and MORIMOTO, Kanehisa. Suppression of the Formation of Sister Chromatid Exchanges by Low Concentrations of Ginsenoside Rh2 in Human Blood Lymphocytes. *Cancer Res.* 1995, vol. 55, n° 6, p. 1221-23.
- ZHAO, Weimin; YE, Qinghua; TAN, Xiaojian; JIANG, Hualiang; LI, Xiaoyu; CHEN, Kaixian; and KINGHORN, Douglas. Three New Sesquiterpene Glycosides from *Dendrobium nobile* with Immunomodulatory Activity. *J. Nat. Prod.* 2001, vol. 64, n° 9, p. 1196–1200.

IX ANEXOS

Anexo 1. Datos de las Personas HIV-1⁺.

Número de Persona	Fecha de Toma de Muestra	Estadio de la Enfermedad	Sexo	Edad
1	08/09/2004	C ²	Femenino	29
2	08/09/2004	B ¹	Masculino	26
3	15/09/2004	C	Masculino	24
4	15/09/2004	B	Femenino	18
5	15/09/2004	C	Masculino	40

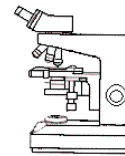
¹ Estadio asintomático, ² Estadio final o SIDA

Anexo 2. Datos de las Personas Saludables.

Número de Persona	Fecha de Toma de Muestra	Sexo	Edad
1	08/09/2004	Femenino	29
2	08/09/2004	Femenino	26
3	08/09/2004	Masculino	24
4	15/09/2004	Femenino	18
5	15/09/2004	Masculino	40

Anexo 3. Recuento de las 4 estirpes celulares para las personas saludables. Persona 1.

LABORATORIO CLINICO
“RIHMEN MEDIC” S.R. Ltda.
 Av José C. Mariátegui San Gabriel – V.M.T.
 Lunes a Sábado 8:00 – 2:00pm / 4:00 – 9:00



Personas saludables	Muestra	Glóbulos Blancos	Neutrófilos	Eosinófilos	Monocitos	Linfocitos
1	CN1	4800	2868	61	143	1640
1	CN2	5000	2970	63	147	1600
1	CN3	4500	2940	66	145	1620
1	EC1	5200	3032	19	122	2090
1	EC2	5400	3052	16	118	2100
1	EC3	5150	3010	18	126	2068
1	EAc1	4900	2912	36	97	1865
1	EAc2	4500	2900	32	95	1868
1	EAc3	5300	2908	31	100	1859
1	EM1	5150	2795	33	162	1890
1	EM2	4500	2802	34	165	1886
1	EM3	5000	2803	32	163	1888

Fecha: 23-08-2004



 Norma Rivas Aroni

CN1: Control negativo, primera réplica.
 CN2: Control negativo, segunda réplica.
 CN3: Control negativo, tercera réplica.

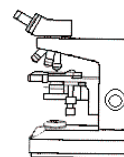
EC1: Extracto Clorofórmico, primera réplica.
 EC2: Extracto Clorofórmico, segunda réplica.
 EC3: Extracto Clorofórmico, tercera réplica.

EAc1: Extracto Acuoso, primera réplica.
 EAc2: Extracto Acuoso, segunda réplica.
 EAc3: Extracto Acuoso, tercera réplica.

EM1: Extracto Metanólico, primera réplica.
 EM2: Extracto Metanólico, segunda réplica.
 EM3: Extracto Metanólico, tercera réplica.

Anexo 4. Recuento de las 4 estirpes celulares para las personas saludables. Persona 2 y 3.

LABORATORIO CLINICO
“RIHMEN MEDIC” S.R. Ltda.
 Av José C. Mariátegui San Gabriel – V.M.T.
 Lunes a Sábado 8:00 – 2:00pm / 4:00 – 9:00



Personas saludables	Muestra	Glóbulos Blancos	Neutrófilos	Eosinófilos	Monocitos	Linfocitos
2	CN1	4750	2995	47	80	1428
2	CN2	3950	2990	42	74	1418
2	CN3	4900	2991	45	76	1420
2	EC1	6000	3307	70	115	2040
2	EC2	5600	3300	72	108	2050
2	EC3	5000	3302	76	110	2048
2	EAc1	4700	3075	62	80	1704
2	EAc2	4600	3069	66	85	1707
2	EAc3	5250	3070	66	82	1707
2	EM1	4300	2958	35	98	1660
2	EM2	4350	2965	28	95	1670
2	EM3	5150	2960	32	92	1659
3	CN1	4200	2620	42	142	1358
3	CN2	3800	2630	38	136	1365
3	CN3	4500	2628	42	139	1360
3	EC1	5400	3395	35	108	2085
3	EC2	5350	3388	40	115	2062
3	EC3	6100	3384	37	112	2078
3	EAc1	5000	3155	30	80	1770
3	EAc2	4950	3165	37	89	1760
3	EAc3	5150	3147	34	84	1758
3	EM1	4900	2910	35	124	1550
3	EM2	4450	2902	30	130	1560
3	EM3	4500	2909	32	120	1553

Fecha: 26-08-2004




 Norma Rivas Aroni

CN1: Control negativo, primera réplica.
 CN2: Control negativo, segunda réplica.
 CN3: Control negativo, tercera réplica.

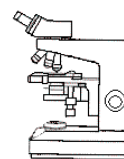
EC1: Extracto Clorofórmico, primera réplica.
 EC2: Extracto Clorofórmico, segunda réplica.
 EC3: Extracto Clorofórmico, tercera réplica.

EAc1: Extracto Acuoso, primera réplica.
 EAc2: Extracto Acuoso, segunda réplica.
 EAc3: Extracto Acuoso, tercera réplica.

EM1: Extracto Metanólico, primera réplica.
 EM2: Extracto Metanólico, segunda réplica.
 EM3: Extracto Metanólico, tercera réplica.

Anexo 5. Recuento de las 4 estirpes celulares para las personas saludables. Persona 4 y 5.

LABORATORIO CLINICO
“RIHMEN MEDIC” S.R. Ltda.
 Av José C. Mariátegui San Gabriel – V.M.T.
 Lunes a Sábado 8:00 – 2:00pm / 4:00 – 9:00



Personas saludables	Muestra	Glóbulos Blancos	Neutrófilos	Eosinófilos	Monocitos	Linfocitos
4	CN1	3900	2598	112	128	1215
4	CN2	4200	2595	102	120	1208
4	CN3	4000	2590	107	119	1205
4	EC1	4400	2690	160	158	1728
4	EC2	4800	2700	155	162	1719
4	EC3	5000	2705	158	155	1717
4	EAc1	3950	2432	148	123	1420
4	EAc2	4050	2418	154	118	1410
4	EAc3	4350	2430	151	129	1408
4	EM1	3750	2420	128	100	1430
4	EM2	4200	2415	119	95	1422
4	EM3	4500	2418	125	96	1425
5	CN1	3800	1960	62	110	1280
5	CN2	3050	1982	58	119	1272
5	CN3	3400	1970	55	113	1276
5	EC1	4300	2232	32	112	1741
5	EC2	3950	2215	25	105	1732
5	EC3	4010	2210	22	110	1720
5	EAc1	4000	2030	99	86	1473
5	EAc2	3450	2015	97	87	1480
5	EAc3	3600	2030	98	84	1469
5	EM1	3550	2036	62	55	1451
5	EM2	3900	2045	68	62	1438
5	EM3	3400	2060	55	61	1452

Fecha: 30-08-2004



Norma Rivas Aroni

CN1: Control negativo, primera réplica.
 CN2: Control negativo, segunda réplica.
 CN3: Control negativo, tercera réplica.

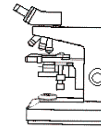
EC1: Extracto Clorofórmico, primera réplica.
 EC2: Extracto Clorofórmico, segunda réplica.
 EC3: Extracto Clorofórmico, tercera réplica.

EAc1: Extracto Acuoso, primera réplica.
 EAc2: Extracto Acuoso, segunda réplica.
 EAc3: Extracto Acuoso, tercera réplica.

EM1: Extracto Metanólico, primera réplica.
 EM2: Extracto Metanólico, segunda réplica.
 EM3: Extracto Metanólico, tercera réplica.

Anexo 6. Recuento de las 4 estirpes celulares para las personas HIV⁺. Persona 1 y 3.

LABORATORIO CLINICO
“RIHMEN MEDIC” S.R. Ltda.
 Av José C. Mariátegui San Gabriel – V.M.T.
 Lunes a Sábado 8:00 – 2:00pm / 4:00 – 9:00



Personas HIV+	Muestra	Glóbulos Blancos	Neutrófilos	Eosinófilos	Monocitos	Linfocitos
1	CN1	2100	1302	21	42	735
1	CN2	2200	1452	22	22	704
1	CN3	2400	1392	48	48	912
1	EC1	2400	1560	24	24	792
1	EC2	2500	1450	50	50	950
1	EC3	2600	1430	52	52	1066
1	EAc1	2000	1220	20	60	700
1	EAc2	2200	1298	44	44	814
1	EAc3	2600	1638	52	26	884
1	EM1	2400	1512	72	48	768
1	EM2	2000	1180	40	20	760
1	EM3	2300	1449	23	23	805
3	CN1	2800	1708	56	56	980
3	CN2	3400	2176	68	136	1020
3	CN3	3900	2457	78	78	1287
3	EC1	4900	2744	147	147	1862
3	EC2	5000	2900	50	50	2000
3	EC3	4100	2460	82	82	1476
3	EAc1	3500	2345	70	70	1015
3	EAc2	3800	2356	38	38	1368
3	EAc3	3300	1782	66	66	1386
3	EM1	3600	2124	72	108	1296
3	EM2	3400	2176	68	34	1122
3	EM3	3200	1920	32	128	1120

Fecha: 08-09-2004



 Norma Rivas Aroni

CN1: Control negativo, primera réplica.
 CN2: Control negativo, segunda réplica.
 CN3: Control negativo, tercera réplica.

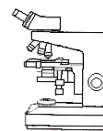
EC1: Extracto Clorofórmico, primera réplica.
 EC2: Extracto Clorofórmico, segunda réplica.
 EC3: Extracto Clorofórmico, tercera réplica.

EAc1: Extracto Acuoso, primera réplica.
 EAc2: Extracto Acuoso, segunda réplica.
 EAc3: Extracto Acuoso, tercera réplica.

EM1: Extracto Metanólico, primera réplica.
 EM2: Extracto Metanólico, segunda réplica.
 EM3: Extracto Metanólico, tercera réplica.

Anexo 7. Recuento de las 4 estirpes celulares para las personas HIV⁺. Persona 4, 5 y 6.

LABORATORIO CLINICO
“RIHMEN MEDIC” S.R. Ltda.
 Av José C. Mariátegui San Gabriel – V.M.T.
 Lunes a Sábado 8:00 – 2:00pm / 4:00 – 9:00



Personas HIV+	Muestra	Glóbulos Blancos	Neutrófilos	Eosinófilos	Monocitos	Linfocitos
4	CN1	1900	1159	57	19	665
4	CN2	1600	992	32	32	544
4	CN3	1500	855	60	30	555
4	EC1	2100	1281	21	21	777
4	EC2	2400	1344	48	48	960
4	EC3	2800	1708	84	28	980
4	EAc1	1800	1134	36	18	612
4	EAc2	1700	1037	34	34	595
4	EAc3	1750	1050	35	18	648
4	EM1	1600	992	32	32	544
4	EM2	1800	1134	18	18	630
4	EM3	1900	1178	19	19	684
5	CN1	2650	1696	53	27	875
5	CN2	2100	1386	21	21	672
5	CN3	2500	1625	50	25	800
5	EC1	4100	2706	82	82	1230
5	EC2	2800	1568	28	84	1120
5	EC3	2900	1769	58	87	986
5	EAc1	3200	2208	32	96	864
5	EAc2	2300	1380	46	69	805
5	EAc3	2400	1392	72	72	864
5	EM1	3000	1920	90	90	900
5	EM2	2800	1736	28	28	1008
5	EM3	2400	1488	72	24	816
6	CN1	1500	945	15	15	525
6	CN2	1600	960	32	32	576
6	CN3	1400	784	28	42	546
6	EC1	2000	1160	40	40	760
6	EC2	1800	1008	36	36	720
6	EC3	2700	1539	54	54	1053
6	EAc1	1900	1121	19	57	703
6	EAc2	1300	780	13	26	481
6	EAc3	1600	912	32	16	640
6	EM1	1650	1023	17	17	594
6	EM2	1500	870	30	15	585
6	EM3	1550	946	31	31	543

Fecha: 15-09-2004



 Norma Rivas Aroni

CN1: Control negativo, primera réplica.
 CN2: Control negativo, segunda réplica.
 CN3: Control negativo, tercera réplica.

EC1: Extracto Clorofórmico, primera réplica.
 EC2: Extracto Clorofórmico, segunda réplica.
 EC3: Extracto Clorofórmico, tercera réplica.

EAc1: Extracto Acuoso, primera réplica.
 EAc2: Extracto Acuoso, segunda réplica.
 EAc3: Extracto Acuoso, tercera réplica.

EM1: Extracto Metanólico, primera réplica.
 EM2: Extracto Metanólico, segunda réplica.
 EM3: Extracto Metanólico, tercera réplica.