

Efecto de *Lepidium meyenii* (maca) sobre la producción de tres citoquinas hematopoyéticas en esplenocitos de ratones inmunosuprimidos

[Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on the production of three hematopoietic cytokines in splenocytes from immunosuppressed mice]

Evelyn ALVAREZ & Libertad ALZAMORA-GONZALES

Laboratorio de Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
Contactos / Contacts: Evelyn ALVAREZ - E-mail address: evelyn.alvarez.salazar@hotmail.com

Abstract

Lepidium meyenii Walp., Brassicaceae (Maca) is a plant native to Peru to conferring immunostimulatory activity. The objective was to evaluate the immunomodulatory effect of the aqueous extract (EAc) of yellow ecotype on gene expression of three hematopoietic cytokines (IL-3, GM-CSF and IL-7) in splenocytes from Balb/c mice immunosuppressed with cyclophosphamide. Levels of mRNA were measured by RT-PCR. Two days after immunosuppression (IS), in splenocytes from mice treated with EAc increased expression of mRNA was demonstrated for IL-3, GM-CSF e IL-7 ($p < 0.05$) compared to the untreated group. Five days after IS, in mice treated with EAc found higher cell counts in bone marrow, peripheral blood and endogenous colonies formed units in spleen compared to the untreated group. It is concluded that administration of EAc in immunocompromised mice can reverse the suppressive effects of cyclophosphamide.

Keywords: *Lepidium meyenii*, immunomodulators extracts, maca, immunostimulatory extracts.

Resumen

Lepidium meyenii Walp., Brassicaceae (Maca) es una planta oriunda del Perú a la que se atribuye actividad inmunoestimuladora. El objetivo fue evaluar el efecto inmunomodulador del extracto acuoso (EAc) del ecotipo amarillo sobre la expresión génica de tres citoquinas hematopoyéticas (IL-3, GM-CSF e IL-7) en esplenocitos de ratones Balb/c inmunosuprimidos con ciclofosfamida. Los niveles de mRNA se midieron por RT-PCR. Dos días después de la inmunosupresión (IS), en los esplenocitos de los ratones tratados con EAc se evidenció mayor expresión de mRNA para IL-3, GM-CSF e IL-7 ($p < 0.05$) respecto al grupo no tratado. Cinco días después de la IS, en los ratones tratados con EAc se encontró mayor recuento de células en la médula ósea, sangre periférica y unidades formadoras de colonias endógenas en el bazo respecto al grupo no tratado. Se concluye que la administración de EAc a ratones inmunocomprometidos puede revertir los efectos supresores de la ciclofosfamida.

Palabras Clave: *Lepidium meyenii*, extractos inmunomoduladores, maca, extractos inmunoestimuladores.

Recibido | Received: 29 de Octubre de 2012.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 22 de Diciembre de 2012.

Publicado en línea | Published online: 30 de Mayo de 2013.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: E Alvarez, L Alzamora-Gonzales. 2013. Efecto de *Lepidium meyenii* (maca) sobre la producción de tres citoquinas hematopoyéticas en esplenocitos de ratones inmunosuprimidos. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 12(3): 313 – 321.

INTRODUCCIÓN

La hematopoyesis es el proceso de formación, desarrollo y maduración de eritrocitos, leucocitos y plaquetas a partir de un precursor celular común e indiferenciado conocido como célula madre en la médula ósea, su evolución normal requiere del estroma medular y de factores de crecimiento hematopoyético (FCH) (Mayani *et al.*, 2007). Los FCH son un conjunto de proteínas llamadas citoquinas que actúan sobre las poblaciones inmaduras potenciando su maduración y proliferación. Entre las más importantes están: el Factor Estimulador de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF), la Interleuquina 7 (IL-7), la interleuquina 3 (IL-3) y la Eritropoyetina (Epo) (Abbas *et al.*, 2008).

La médula ósea es un órgano de continua proliferación y renovación de células sanguíneas, por lo tanto es la más afectada durante cualquier terapia de inmunosupresión con fármacos citotóxicos como la ciclofosfamida. La pérdida de células madre y la incapacidad de regeneración de nuevas células sanguíneas de la médula ósea se traducirán en anemia, leucopenia y trombocitopenia (Haubitz, 2007). Actualmente, se está aplicando esta droga antineoplásica en combinación con varios agentes detoxificantes e inmunomoduladores con el fin de reducir o eliminar sus efectos tóxicos adversos, sin embargo su uso en todos los pacientes no se considera costo efectivo (Jena *et al.*, 2010).

Muchas de las plantas utilizadas en la medicina tradicional han demostrado poseer efecto protector frente a la toxicidad de las radiaciones y drogas citotóxicas, sugiriendo sus potenciales usos como suplemento alimenticio en pacientes cuyo sistema hematopoyético ha sido alterado por la quimio/radioterapia. Shin *et al.* (2008) demostraron que Myelophil, que es una mezcla de *Astragali radix* y *Salviae radix*, produjo el incremento de los parámetros hematológicos, el recuento de progenitores hematopoyéticos en ensayos clonogénicos y sobre-reguló la expresión de IL-3 en el bazo de ratones inmunosuprimidos con una dosis de 0.3 g/kg de 5-Fluorouracilo. Otro trabajo señaló que el extracto acuoso rico en polisacáridos de *Polygoni multiflori Radix praeparata*, es capaz de producir el incremento significativo de los niveles de IL-2, parámetros hematológicos, perfil anti-oxidante y promover la hematopoyesis esplénica mediante la sobre-expresión del receptor de la eritropoyetina y el factor de

transcripción GATA-1 en animales inmunosuprimidos por 5 días con 40 mg/kg/día de CF (Chen *et al.*, 2012).

Lepidium meyenii Walpers (maca) es una especie nativa peruana distribuida en las regiones Suni y Puna de los Departamentos de Junín y Pasco ubicados en altitudes que oscilan desde los 3700 hasta los 4450 msnm. Estudios sobre sus metabolitos secundarios señalan la presencia de alcaloides, esteroides, glucosinolatos, isotiocianatos, macamidas, antocianinas, flavonoides, taninos y saponinas (Muhammad *et al.*, 2002; Valentová y Ulrichová, 2003). La porción comestible de esta planta es la raíz que se aprecia mucho por su alto valor nutritivo y energético, por lo que su importancia económica está vinculada principalmente a sus propiedades revitalizantes, vigorizantes y estimulantes de la reproducción (Obregón, 1998).

Es así como en los últimos años se han evaluado científicamente muchas de sus propiedades, confirmando los mencionados y aportando otras (Wanga *et al.*, 2007; Gonzales, 2012). Se comprobaron sus propiedades antitumorales e inmunomoduladoras, al estimular tanto la respuesta inmune humoral como celular (Alzamora, 2003; Alzamora *et al.*, 2004). Sobre el efecto de la maca en la hematopoyesis se reportó que el extracto acuoso del ecotipo amarillo favoreció significativamente el incremento de glóbulos blancos, hemoglobina y recuento de células de médula ósea en animales inmunosuprimidos con 50 mg/kg de ciclofosfamida (Torres, 2008), señalando un posible efecto estimulador en las células madre/progenitoras hematopoyéticas, estas células responden a una serie de citoquinas hematopoyéticas del estroma medular que regulan su proliferación y diferenciación a células maduras.

El objetivo fue evaluar el efecto modulador del extracto acuoso de maca sobre la expresión génica de tres citoquinas hematopoyéticas (IL-3, GM-CSF e IL-7) en un modelo de mielosupresión experimental en ratones, y a la vez determinar su capacidad estimuladora sobre la celularidad de la médula ósea y de sangre circulante, y sobre el recuento de precursores hematopoyéticos pluripotentes que forman colonias macroscópicas en la superficie del bazo que también es un órgano linfóide primario en ratones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparación del extracto acuoso

Se colectaron raíces de maca -ecotipo amarillo- procedentes de Carhuamayo (Dpto. de Junín – Perú, 4000 metros de altitud). Su registro taxonómico fue realizado por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Las raíces frescas se cortaron en pequeños trozos que fueron secados, molidos y tamizados hasta obtener un polvo muy fino (maca pulverizada) que se empleó para preparar el extracto acuoso. Para ello se mezclaron la harina de maca con agua destilada en una proporción 1:10, la mezcla se sometió a hervido durante 15 minutos y luego se centrifugó para obtener el sobrenadante, que posteriormente se secó a 45 °C en estufa de aire circulante. El producto resultante se utilizó para preparar la dosis de trabajo.

Animales de experimentación e Inmunosupresión

Se emplearon ratones hembra Balb/c procedentes del Instituto Nacional de Salud de Lima-Perú, de cuatro semanas de edad y con pesos promedios de 25 gramos. Los animales fueron distribuidos en 6 grupos (n=6), los grupos 1 y 2 fueron inmunosuprimidos (IS) 2 días antes que concluya el experimento: IS2d-EAc y IS2d-Sin EAc, los grupos 3 y 4 fueron IS 5 días antes que concluya el experimento: IS5d-EAc y IS5d-Sin EAc, y los grupos 5 y 6 no fueron IS, el grupo 5 recibió EAc y el 6 no lo recibió (Sin EAc). Tres grupos fueron tratados con el extracto acuoso (EAc) y tres no fueron tratados (Sin EAc). La inmunosupresión se realizó la última semana del experimento por vía intraperitoneal empleando una dosis de 130 mg/kg p.c. de ciclofosfamida (CF) (NEOPHOS 200) contenida en 0.2 ml.

Los grupos IS2d-EAc, IS5d-EAc y EAc recibieron el EAc de maca por vía oral, a la dosis de 200 mg/kg de peso corporal (p.c.) durante dos meses y los otros tres recibieron agua pura en las mismas condiciones (grupos IS2d-Sin EAc y Sin EAc). Los ratones fueron colocados en un ambiente de humedad y temperatura controlada, el agua y los alimentos

fueron dispuestos *ad libitum*. Al final del experimento los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

Determinación de la expresión de mRNA para las citoquinas hematopoyéticas: IL-3, GM-CSF e IL-7 en esplenocitos

Se realizaron suspensiones del bazo, en medio RPMI-1640. El RNA fue aislado a partir de las suspensiones celulares, por medio del método de extracción fenólica con TRIZOL® (Invitrogen, Life Technologies, EE.UU.). El RNA obtenido (0.2 µg/µl) fue sometido a una transcripción reversa para la síntesis de cDNA, mediante el empleo del Kit High capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante.

El cDNA sintetizado fue posteriormente amplificado mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando *primers* específicos para los genes de interés junto con el gen de referencia (GAPDH) para normalizar los resultados (Tabla 1). Las condiciones del PCR fueron: un paso de 94 °C por 5 minutos (desnaturalización inicial) y 35 ciclos de 94 °C por 30 s (desnaturalización), 55 °C por 30 s (alineamiento) y 72 °C por 45 s (extensión).

Los productos obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa horizontal al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) a 100 voltios durante 50 minutos. Las bandas resultantes se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Biometra TI 1) y fueron fotografiadas con una cámara digital. Las imágenes digitales obtenidas en color real fueron seleccionadas y transformadas en una imagen en escala de grises para estimar la intensidad de las bandas mediante el Programa de análisis de imagen TotalLab Quant que mide el nivel de gris medio de cada una (www.totallab.com/products/totallabquant/) de las bandas analizadas, como una manera indirecta de calcular su densidad (Arrebola *et al.*, 1998). Todos los valores, expresados en niveles de grises, fueron normalizados a su respectivo gen de referencia (GAPDH) como sigue:

$$\% \text{ cambio en la expresión} = \frac{\text{Nivel de gris Gen de estudio}}{\text{Nivel de gris Gen de referencia}} \times 100$$

Tabla 1
Secuencia de los primers empleados en las reacciones de PCR

| Nombre del Gen | Secuencias de los primers (5' - 3') | Tamaño del amplicón (pares de bases) | Nº de acceso Gen Bank |
|----------------|--|--------------------------------------|-----------------------|
| IL-3 | FW: TACATCTGCGAATGACTCTGC RV: GGCTGAGGTGGTCTAGAGGTT | 132 | NM_010556.4 |
| GM-CSF | FW: ACCACCTATGCGGATTTTCAT RW: TCATTACGCAGGCACAAAAG | 146 | NM_009969-4 |
| IL-7 | FW: GTGCTGCTCGCAAGTTGAAG RW: AGTTCACCAGTGTGTGTGC | 102 | NM_008371.4 |
| GAPDH | FW: TGCACCACCAACTGCTTAGC RV: GGCATGGACTGTGGTCATGAG | 258 | NM_008084 |

IL-3: Interleuquina 3, GM-CSF: Factor estimulador de colonias de Granulocitos y Macrófagos; IL-7: Interleuquina 7; GAPDH: Gliceraldehído 3-Fosfato deshidrogenasa; PCR: Reacción en cadena de polimerasa.

Recuento de células nucleadas de la médula ósea y sangre circulante

Al cabo del tratamiento se realizaron suspensiones celulares de la médula ósea empleando los dos fémures en medio RPMI-1640 y se colectó sangre de cada ratón por punción cardiaca en tubo con EDTA. Los glóbulos rojos se lisaron con solución TURK. El recuento se realizó en una cámara de Neubauer.

Recuento de unidades formadoras de colonias endógenas en el bazo (CFU-S)

Al término del tratamiento, se fijaron los bazos de los ratones en solución Bouin por 24 horas a 4 °C, luego se lavaron los bazos con agua corriente hasta total eliminación del fijador. Después del lavado, se contó el número de colonias macroscópicas formadas en su superficie identificadas como nódulos, con ayuda de un microscopio estereoscópico LEICA Zoom 2000™.

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados usando el paquete estadístico SPSS (versión 15). Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar y las diferencias entre dos grupos se determinaron mediante el análisis de varianza Levene seguido de la prueba T de Student. Los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Expresión de mRNA para las citoquinas hematopoyéticas IL-3, GM-CSF e IL-7 en esplenocitos murinos

Dos días después de la IS, los niveles de expresión génica de IL-3, GM-CSF e IL-7 se redujeron drásticamente en los esplenocitos ($p < 0.05$), pero el tratamiento con el extracto acuoso amortiguó estos efectos. Cinco días post-tratamiento con ciclofosfamida (CF) se observó un incremento significativo en el nivel de expresión de las tres citoquinas evaluadas, siendo superior incluso a los valores obtenidos en los ratones no inmunosuprimidos (EAc y Sin EAc).

El grupo IS2d-EAc presentó mayor expresión génica de IL-3 con respecto al grupo IS2d-Sin EAc (10 veces más), pero fue menor al presentado por los grupos evaluados 5 días post-CF, donde es notorio un incremento en los niveles de expresión para esta citoquina en ambos grupos inmunosuprimidos, aunque el grupo IS5d-Sin EAc mostró mayor producción que el grupo IS5d-EAc (pero solo fue 1.2 veces más). Entre los grupos no inmunosuprimidos, el bazo de los ratones tratados con el extracto (grupo EAc) mostraron mayor expresión génica para IL-3 con respecto a grupo Sin EAc (2.5 veces más) (Figura 2A). El tratamiento con el EAc provocó un aumento en los niveles de mRNA para GM-CSF en el grupo IS2d-EAc respecto al grupo IS2d-Sin EAc (1.3 veces más). No se encontraron diferencias de expresión entre los

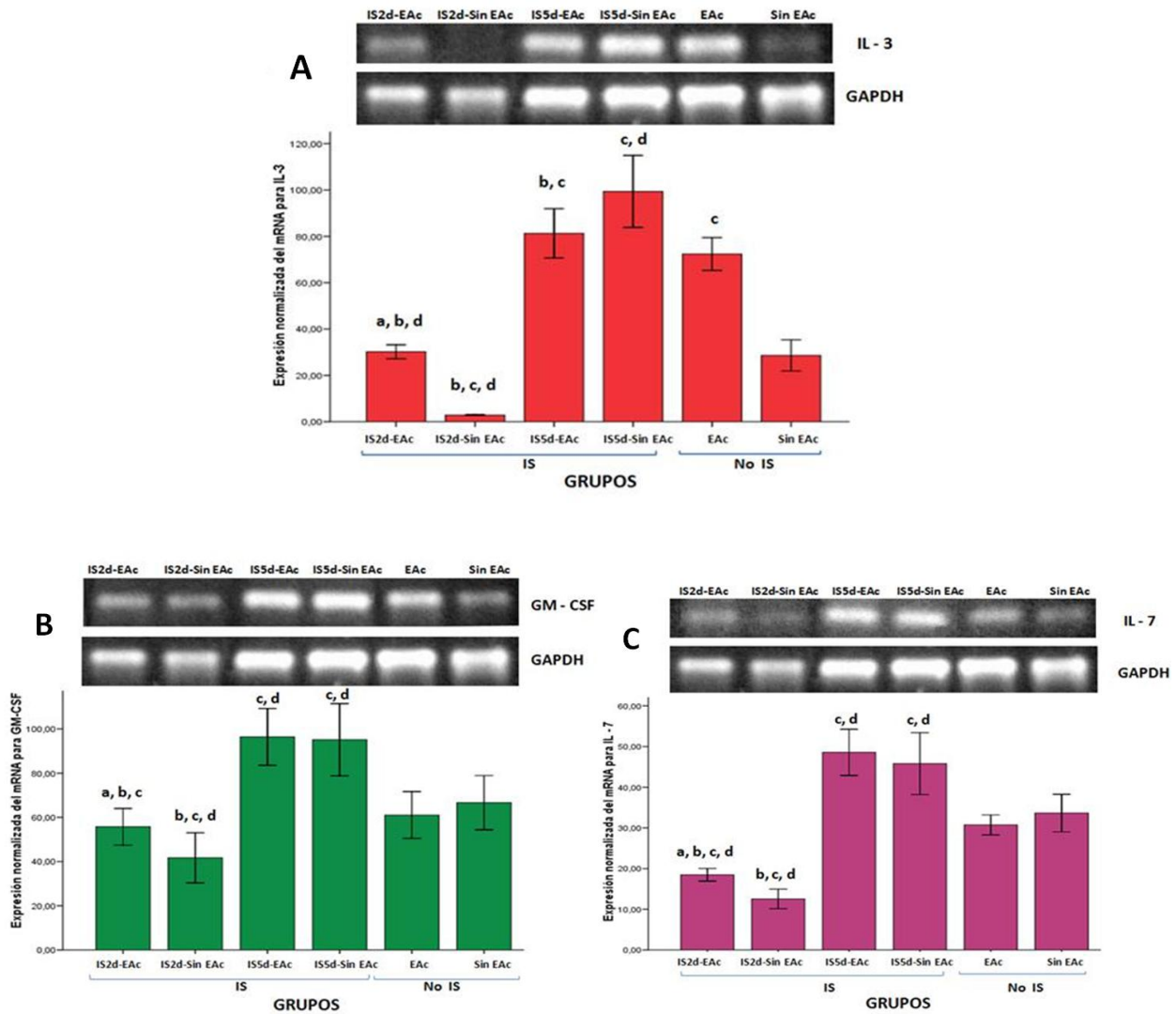
grupos evaluados 5 días post-CF, ni entre los grupos no inmunosuprimidos (Figura 2B). Los mismos resultados se observaron para los niveles de expresión de IL-7, sólo se observaron diferencias significativas

entre los ratones evaluados 2 días post-CF, donde el grupo IS2d-EAc mostró mayor expresión génica para IL-7 (1.5 veces más) respecto al grupo IS2d-Sin EAc (Figura 2C).

Figura 2

Efecto de EAc sobre la expresión de mRNA de IL-3 (A), GM-CSF (B) e IL-7 (C) en el bazo de ratones ISs con CF. La imagen sobre las barras representa al gel de los productos obtenidos por RT-PCR. Los datos fueron normalizados con los valores de GAPDH. EAc: Extracto acuoso de maca; IS2d: Inmunosuprimidos 2 días antes de terminar el experimento; IS5d: Inmunosuprimidos 5 días antes de terminar el experimento. Prueba T – Student.

- ^a p < 0.05 vs el grupo IS2d – Sin EAc
- ^b p < 0.05 vs el grupo IS5d – Sin EAc
- ^c p < 0.05 vs el grupo Sin EAc
- ^d p < 0.05 vs el grupo EAc



Celularidad total de médula ósea y sangre circulante

La inmunosupresión provocó un descenso significativo en el recuento de células nucleadas de la médula ósea y sangre periférica con respecto a los ratones no inmunosuprimidos ($p < 0.05$). No se registraron diferencias de recuento entre los grupos IS2d-EAc e IS2d-Sin EAc. A 5 días post-CF se evidenció una recuperación de la celularidad, los ratones del grupo IS5d-EAc mostraron mayor recuento

con respecto al grupo IS5d-Sin EAc ($p < 0.05$), pero fueron inferiores respecto a los no inmunosuprimidos. Entre los grupos no inmunosuprimidos, los ratones tratados con EAc mostraron mayor recuento de médula ósea con respecto a los no tratados (Sin EAc). No hubo diferencia entre los promedios celulares de sangre periférica de los grupos EAc y Sin EAc (Tabla 2).

Tabla 2

Efecto del extracto acuoso de maca sobre el recuento de células nucleadas de médula ósea y sangre circulante en ratones inmunosuprimidos con Ciclofosfamida.

| Grupos | Médula Ósea (n° células/ μ l) | Sangre circulante (n° células/ μ l) |
|----------------|--|--|
| IS2d – EAc | 1981.25 \pm 750.38 ^{b,c,d} | 1792.86 \pm 242.26 ^{c,d} |
| IS2d – Sin EAc | 2331.25 \pm 739.19 ^{b,c,d} | 1750.00 \pm 147.20 ^{c,d} |
| IS5d – EAc | 6505.00 \pm 1141.26 ^{b,c,d} | 2582.14 \pm 452.60 ^{b,c,d} |
| IS5d – Sin EAc | 4860.42 \pm 1432.08 ^{c,d} | 1910.00 \pm 397.40 ^{c,d} |
| EAc | 8485.00 \pm 646.06 ^c | 4717.86 \pm 2073.79 |
| Sin EAc | 7516.67 \pm 693.61 | 4971.05 \pm 1245.69 |

EAc: Extracto acuoso de maca; IS2d: Inmunosuprimidos 2 días antes de terminar el experimento; IS5d: Inmunosuprimidos 5 días antes de terminar el experimento

^a $p < 0.05$ vs el grupo IS2d – Sin EAc

^b $p < 0.05$ vs el grupo IS5d – Sin EAc

^c $p < 0.05$ vs el grupo Sin EAc

^d $p < 0.05$ vs el grupo EAc

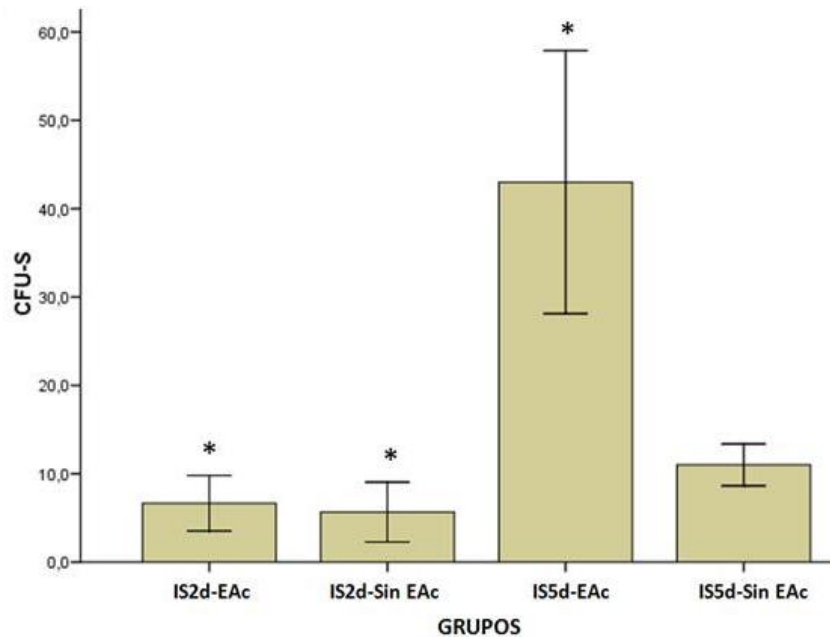
Unidades formadoras de colonias endógenas en bazo (CFU-S)

Los ratones del grupo IS5d-EAc mostraron un mayor recuento significativo de macrocolonias en la superficie del bazo en comparación con los otros

grupos inmunosuprimidos. No se encontró diferencias significativas de recuento entre los grupos IS2d-EAc, IS2d-Sin EAc, sin embargo ambos fueron inferiores con respecto al grupo IS5d-Sin EAc ($p < 0.05$) (Figura 1).

Figura 1

Efecto del extracto de maca sobre el recuento de las unidades formadoras de colonia esplénica (CFU-S) de ratones inmunosuprimidos con Ciclofosfamida. Extracto acuoso de maca; IS2d: Inmunosuprimidos 2 días antes de terminar el experimento; IS5d: Inmunosuprimidos 5 días antes de terminar el experimento. * $p < 0.05$ vs el grupo IS5d – Sin EAc.



DISCUSIÓN

La maca es una planta nativa peruana muy conocida por sus efectos sobre la reproducción, también ha demostrado poseer actividades inmunomoduladoras, estimulando tanto la respuesta inmune humoral y celular (Alzamora, 2003). Debido a que los efectos estimulatorios de un compuesto o suplemento nutricional son difíciles de evaluar en personas o animales saludables, se usó ciclofosfamida en un modelo murino, como una aproximación para los estudios de inmunomodulación en individuos inmunocomprometidos (Huyan *et al.*, 2011).

El recuento de células nucleadas de la médula ósea y sangre periféricas son los principales parámetros clínicos que reflejan el daño de las drogas citotóxicas. Efectivamente, los ratones inmunosuprimidos presentaron los menores recuentos celulares, y esto es debido a que el metabolismo de la CF por la enzimas hepáticas generan sustancias alquilantes que interfieren con las síntesis de DNA afectando a las células en división activa como las células madre/progenitoras de la médula ósea, provocando la muerte celular (Patra *et al.*, 2012), y

radicales libres que inducen estrés oxidativo en las células del organismo (Tripathi y Jena, 2009). Sin embargo los grupos tratados con el extracto presentan un mayor recuento de médula ósea y sangre periférica a 5 días post- CF (Tabla 2); la estimulación de la proliferación de las células de médula ósea es un indicador que el extracto es capaz de promover la hematopoyesis medular, que se ve reflejada en un mayor recuento en la periferia.

En el ratón, la hematopoyesis no solo puede ocurrir en la médula ósea sino también en órganos fuera de ella como el bazo, contribuyendo a la hematopoyesis medular en condiciones de estrés, como una reacción compensatoria a la inmunosupresión inducida por CF, ya que la médula ósea se vuelve inadecuada para mantener una hematopoyesis normal (Kim, 2010). El recuento de los nódulos macroscópicos en el bazo, es una medida indirecta de la frecuencia de células madre/progenitoras que derivan de la médula ósea formando discretos nódulos en la superficie del bazo (Parekkadan y Yarmush, 2009). Los ratones del grupo IS5d-EAc mostraron un incremento significativo en el

recuento de colonias (Figura 1), señalando que hay una mayor migración de células pluripotentes de la médula ósea al bazo donde encuentran las condiciones necesarias para proliferar y diferenciarse; esto puede deberse a un mayor número de sobrevivientes progenitores en la médula de los ratones IS y tratados con el extracto, y/o responden mucho mejor a los factores quimiotácticos para su migración.

La inmunosupresión redujo drásticamente los niveles de expresión de IL-3, FSC-GM y IL-7 en el bazo, a dos días post-CF (Grupo IS2d-Sin EAc) al compararlos con los no inmunosuprimidos ($p < 0.05$), pero el tratamiento con el extracto acuoso amortiguó estos efectos (Grupo IS2d-EAc) (Figura 2). A 5 días post-CF se observa un incremento significativo en los niveles de expresión de las tres citoquinas evaluadas, siendo superior incluso a los valores obtenidos en los ratones no inmunosuprimidos (EAc y Sin EAc). Un incremento en la producción de las tres citocinas está asociado a una hematopoyesis creciente en el bazo en ambos linajes: mieloides (IL-3, GM-CSF) y linfocitos (IL-7), además de una mayor supervivencia y función efectora de las células diferenciadas (de Groot *et al.*, 1998, Ceredig y Rolink, 2012). Como la producción de estas citoquinas es realizada por las células estromales y accesorias, es probable que estas células provenientes de ratones tratados con el extracto, respondan en menor tiempo (a dos días post-CF) ante una emergencia y secreten estas citoquinas para restaurar la homeostasis hematopoyética. La mayor expresión de las 3 citoquinas a 5 días post-CF en todos los grupos (IS5d-EAc e IS5d-Sin EAc) señala una fuerte producción hematopoyética en el bazo. Además, la mayor producción de estas citoquinas en los grupos tratados con el extracto, también influenciaría en la repoblación de las células de la médula ósea, sangre periférica y el incremento de CFU-S, debido al importante papel que juegan estas citoquinas en la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células madre y progenitoras hematopoyéticas.

CONCLUSIONES

Se concluye que la administración del extracto acuoso de maca a ratones inmunosuprimidos con CF puede revertir los efectos supresores de este agente citotóxico, que fue demostrada por el mayor recuento de células de médula ósea, sangre periférica, unidades formadoras de colonias esplénicas y producción de mRNA para IL-3, GM-CSF e IL-7 en el bazo, modulando la actividad hematopoyética y ofreciendo

protección frente a la mielosupresión inducida por ciclofosfamida.

REFERENCIAS

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. 2008. **Inmunología celular y molecular**. 6ta edición. Ed. Elsevier Saunders, España.
- Alzamora-Gonzales, L. 2003. **Estudio del efecto antitumoral e inmunomodulador del extracto clorofórmico de raíces de *Lepidium peruvianum* G. Chacón "Maca" (Brassicaceae) en ratones**. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Alzamora L, Ávila G, Colona E, García J, Olivera J, Alzamora D. 2004. **Immunostimulation by aqueous extract from *Lepidium peruvianum* (Maca) on cyclophosphamide-induced suppression mice**. Libro de resúmenes del XIII Reunión científica del ICBAR, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Arrebola F, Masseroli M, O'Valle F, Reguero E, Olmo A, Aguilar M, Del Moral R. 1998. **Cuantificación de ácidos nucleicos desarrollados en gel de agarosa. Diseño y validación de un método simple de análisis digital de imagen**. Comunicación N° 046, II Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica.
- Ceredig R, Rolink AG. 2012. The key role of IL-7 in lymphopoiesis. **Semin Immunol** 24: 159 - 164.
- Chen Q, Zhang S, Ying H, Dai X, Li X, Yu CH Ye H. 2012. Chemical characterization and immunostimulatory effects of a polysaccharide from *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* in cyclophosphamide-induced anemic mice. **Carbohydrate Polymers** 88: 1476 - 1482.
- de Groot RP, Coffey PJ, Koenderman L. 1998. Regulation of proliferation, differentiation and survival by the IL-3/IL-5/GM-CSF receptor family. **Cell Signal** 10: 619 - 628.
- Gonzales GF. 2012. Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. **Evid-Based Compl Alternat Med** 2012: 1 - 10.
- Haubitz M. 2007. Acute and long-term toxicity of cyclophosphamide. **Transplantations medizin** 19: 26 - 31.

- Huyan XH, Lin YP, Gao T, Chen RY, Fan YM. 2011. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. **Int Immunopharmacol** 11: 1293 - 1297.
- Jena G, Vikram A, Tripathi DN, Ramarao P. 2010. Use of chemoprotectants in chemotherapy and radiation therapy: the challenges of selecting an appropriate agent. **Integr Cancer Ther** 9: 253 - 258.
- Kim CH. 2010. Homeostatic and pathogenic extramedullary hematopoiesis. **J Blood Med** 1: 13 - 19.
- Mayani H, Flores E, Pelayo R, Montesinos J, Flores P, Chávez A. 2007. Hematopoiesis. **Cancerología** 2: 95 - 107.
- Muhammad I, Zhao J, Chuck D, Khan I. 2002. Constituents of *Lepidium meyenii* (maca). **Phytochemistry** 59: 105 - 110.
- Obregón L. 1998. "Maca" **Planta medicinal y nutritiva del Perú**. 1era edición. Instituto de Fitoterapia Americano, Lima, Perú.
- Parekkadan B, Yarmush M. 2009. **Methods in Bioengineering: Stem Cell Bioengineering**. Artech House, United States.
- Patra K, Bose S, Sarkar S, Rakshit J, Jana S, Mukherjee A, Roy A, Mandal DP, Bhattacharjee S. 2012. Amelioration of cyclophosphamide induced myelosuppression and oxidative stress by cinnamic acid. **Chem Biol Interact** 195: 231 - 239.
- Shin JW, Lee MM, Son JY, Lee NH, Cho CK, Chung WK, Cho JH, Son CG. 2008. Myelophil, a mixture of *Astragali Radix* and *Salviae Radix* extract, moderates toxic side effects of fluorouracil in mice. **World J Gastroenterol** 14: 2323 - 2328.
- Torres D. 2008. **Efecto modulador de la respuesta inmune humoral de extractos de *Lepidium peruvianum* Chacón (Maca) en ratones inmunosuprimidos con ciclofosfamida**. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Tripathi DN, Jena GB. 2009. Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. **Chem Biol Interact** 180: 398 - 406.
- Valentová K, Ulrichová J. 2003. *Smallanthus Sonchifolius* and *Lepidium meyenii*-Prospective andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomed Papers** 147: 119 - 130.
- Wanga Y, Wanga Y, McNeilc B, Harveyc L. 2007. Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. **Food Res Int** 40: 783 - 792.