

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS BIOQUIMICAS Y**  
**BIOTECNOLOGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**



**“EFECTO NEUROPROTECTOR DE EXTRACTO DE *Lepidium meyenii* “MACA”  
EN CELULAS DE NEUROBLASTOMA (SH-SY5Y) CON ESTRES OXIDATIVO  
INDUCIDO POR PEROXIDO DE HIDROGENO”**

**Trabajo de Tesis presentada por la Bachiller en Farmacia y Bioquímica:  
CALLAPIÑA FARFAN, VANESSA**

**Asesor:**

**Mgs. PAREDES FUENTES, JULITZA**

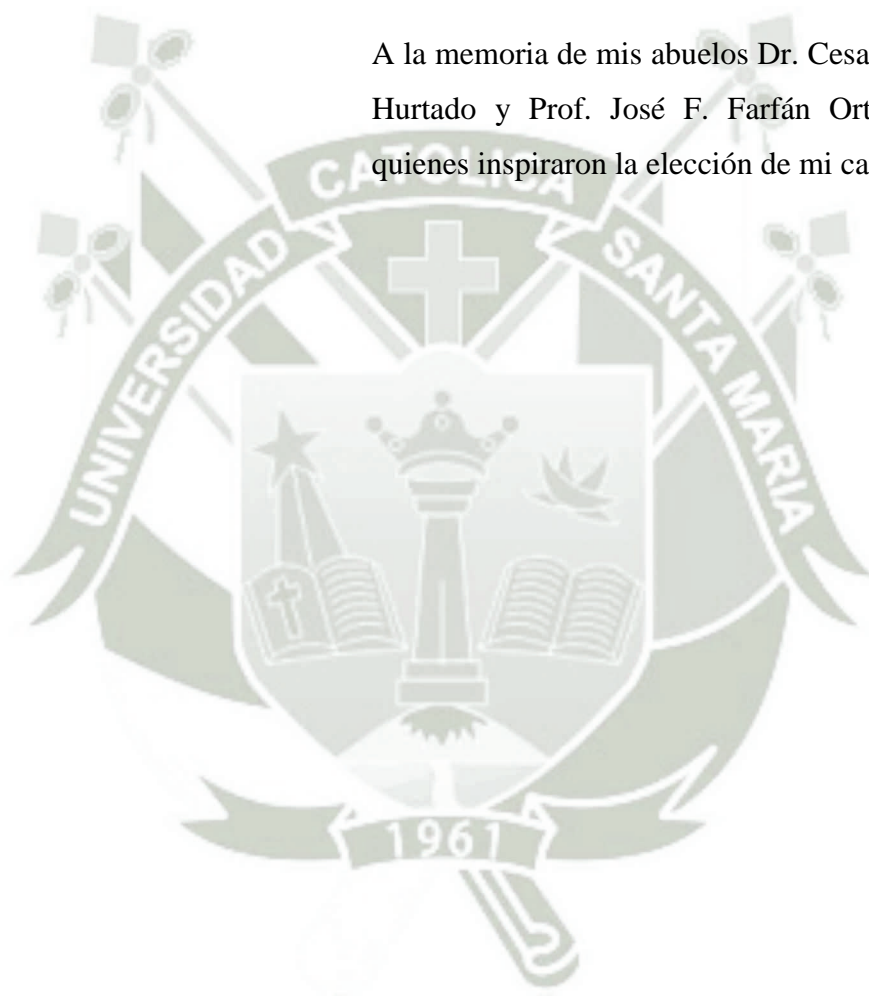
**Para optar el título profesional de:  
QUIMICO FARMACEUTICO**

**AREQUIPA – PERU**

**2017**

## DEDICATORIA

A la memoria de mis abuelos Dr. Cesar N. Callapiña  
Hurtado y Prof. José F. Farfán Ortiz de Orue ,  
quienes inspiraron la elección de mi carrera.



## AGRADECIMIENTO

A Dios, por su amor, misericordia y sus infinitas bendiciones, permitiendo culminar la carrera.

A mis padres, Julia Farfán Galindo y Julio Cesar Callapiña Letona por su apoyo incondicional, ofreciéndome día a día enseñanzas y mensajes de aliento .

A mi hermana Anahy, y Molly por estar presentes.

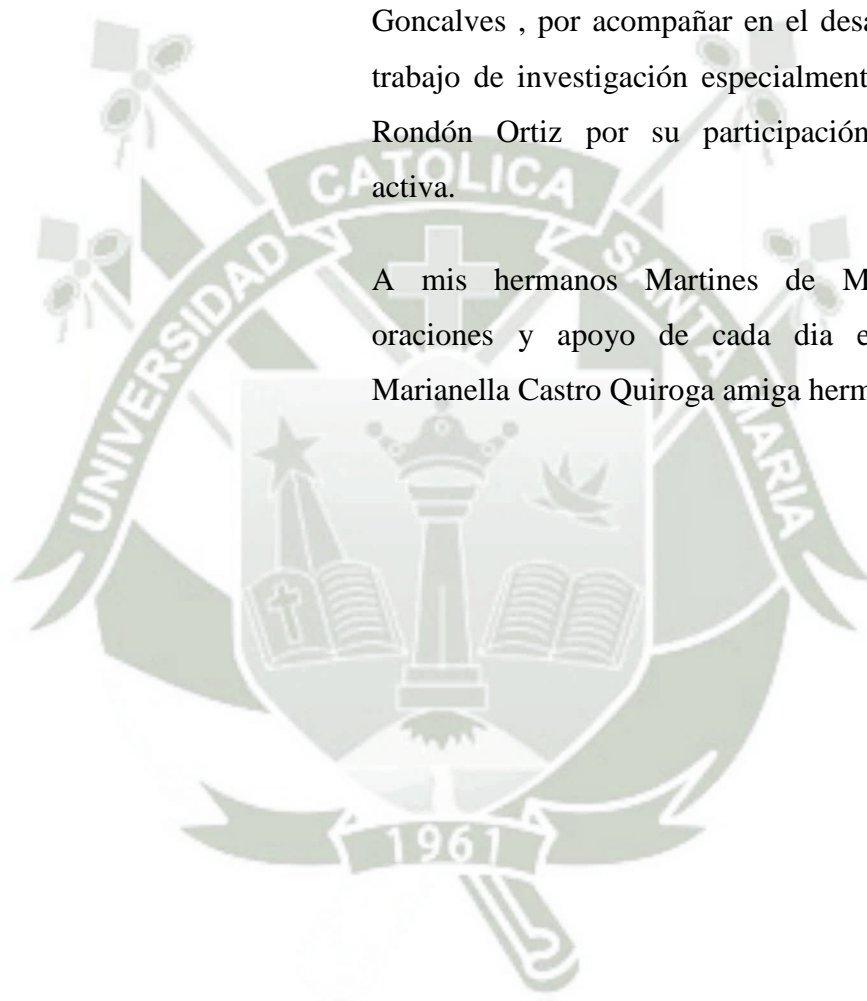
A mi asesora Julitza Paredes, por su tiempo y su orientación profesional .

A la Universidad Católica de Santa María y la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, por brindarme una educación de calidad y los prestigiosos docentes, quienes contribuyeron en mi formación académica, personal y social.

A la Universidad Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences, en especial al Dr. Alejandro Pino Figueroa, que durante el internado farmacéutico, me brindó la oportunidad de investigación con paciencia y amabilidad.

A mi equipo de trabajo Ana Caroline Gabriel Goncalves , por acompañar en el desarrollo de este trabajo de investigación especialmente a Alejandro Rondón Ortiz por su participación y dirección activa.

A mis hermanos Martines de MAC por sus oraciones y apoyo de cada día en especial a Marianella Castro Quiroga amiga hermana y guía.



## INDICE

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>8</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
<b>HIPOTESIS.....</b>	<b>11</b>
<b>CAPITULO I .....</b>	<b>12</b>
<b>MARCO TEORICO.....</b>	<b>12</b>
1. <i>lepidium meyenii</i> “maca” .....	12
2. ESTRES OXIDATIVO .....	19
3. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	29
4. AVANCES DE INVESTIGACION.....	34
5. CULTIVO CELULAR.....	35
6. CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y .....	37
7. 4-NITROFENYL 4-(3-FENOXYBENCIL)PIPERAZINA-1-CARBOXILATO JZL195... ..	37
<b>CAPITULO II.....</b>	<b>38</b>
<b>MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>38</b>
1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	38
2. CULTIVO DE CELULAS DE NEUROBLASTOMA .....	39
3. PREPARACION DE ESTANDARES DEL PEROXIDO DE HIDROGENO .....	40
4. ENSAYO DE MTS .....	41
4.1. EFECTO DE PEROXIDO DE HIDROGENO PARA PRODUCCION DE ESTRES OXIDATIVO EN CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y .....	41
<b>CAPITULO III .....</b>	<b>51</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>51</b>
1. CULTIVO DE CELULAS NEUROBLASTOMA .....	51
2. EFECTO SOBRE EL DAÑO DE LAS CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y PRODUCIDO POR PEROXIDO DE HIDROGENO.....	52
3. EVALUACION DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y PRETRATADAS CON EXTRACTO DE <i>lepidium meyenii</i> “maca” SEGUIDO POR PEROXIDO DE HIDROGENO .....	55
4. ESTUDIO COMPARATIVO DE <i>lepidium meyenii</i> “maca” PERU CON 4-NITROFENYL 4- (3-FENOXYBENCIL)PIPERAZINA-1-CARBOXILATO JZL195 .....	62
5. ESTUDIO COMPARATIVO DE <i>lepidium meyenii</i> “maca” AMAZON CON 4- NITROFENYL 4-(3-FENOXYBENCIL)PIPERAZINA-1-CARBOXILATO JZL195 .....	62

6. ESTUDIO COMPARATIVO DE <i>lepidium meyenii</i> “maca” AMAZON CON <i>lepidium meyenii</i> “maca” PERU .....	63
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>65</b>
<b>SUGERENCIAS</b> .....	<b>66</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>67</b>
<b>ANEXO 1</b> .....	<b>72</b>
<b>ANEXO 2</b> .....	<b>73</b>
<b>ANEXO 3</b> .....	<b>74</b>
<b>ANEXO 4</b> .....	<b>77</b>



## RESUMEN

Basándonos en los datos estadísticos del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) del MINSA se ha encontrado que en el Perú alrededor de 300 000 personas sufren de Alzheimer; esta enfermedad neurodegenerativa en progreso, produce la pérdida de memoria y de capacidades cognitivas. Aun no existe un tratamiento que retarde las consecuencias de esta enfermedad y solo un 30% de los pacientes responden al tratamiento farmacológico. El Alzheimer es causado por acumulación de péptido beta-amiloide depositado en neuronas y por un proceso de oxidación a nivel neuronal; para su tratamiento se necesita complementar alternativas de investigación terapéuticas naturales.

Por ello el presente trabajo tiene como propósito investigar la evaluación del efecto neuroprotector de dos tipos de extractos de *lepidium meyenii* “maca” determinando la concentración óptima que produzca la disminución de estrés oxidativo en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y usando como control al 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 (inhibidor del ácido graso amida hidrolasa (FAAH) y lipasa monoacilglicerol (MAGL), las enzimas principales responsables de la degradación de los endocannabinoides) el cual se usa como tratamiento de estrés oxidativo en investigaciones. Para inducir estrés oxidativo se expuso a las células de neuroblastoma SH-SY5Y a peróxido de hidrógeno a una concentración de 10 mM, produciendo daño significativo y disminuyendo el porcentaje de viabilidad hasta un 42.5 % de las células. Se evaluaron los extractos de *lepidium meyenii* “maca” Perú y *lepidium meyenii* “maca” Amazon a concentraciones 0.2 ppm, 1.0 ppm y 2.0 ppm demostrando que ambas especies presentan efecto neuroprotector al incrementar la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y hasta un 77.7 % y 70.0 % respectivamente al ser tratadas con peróxido de hidrógeno (agente inductor de daño celular). Así mismo los resultados de

ambas especies de *lepidium meyenii* “maca” se evaluaron con 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato (JZL195) en el cual se observa viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y hasta un 98.4 % a las mismas concentraciones de los extractos. Dicho estudio comparativo de *lepidium meyenii* “maca” Perú y *lepidium meyenii* “maca” Amazon con 4-(3-fenoxybenzyl) piperazine-1-carboxylate (JZL195) muestra que ambas especies de *lepidium meyenii* “maca” no incrementan el porcentaje de viabilidad hasta niveles similares a 4-(3-fenoxybenzyl) piperazine-1-carboxylate (JZL195) a un 95 % de confianza. Sin embargo se demostró que no existe diferencia significativa entre ambas *lepidium meyenii* “maca” a un 95 % de confianza.

**PALABRAS CLAVES** (estrés oxidativo, *lepidium meyenii* “maca”, enfermedad de Alzheimer, células de neuroblastoma SH-SY5Y)



## ABSTRACT

Based on the statistical data from the National Institute of Neurological Sciences (INCN) MINSA has been found that in Peru about 300 000 people suffer from Alzheimer's disease, neurodegenerative disease, in progress causes loss of memory and cognitive abilities. Although there is no treatment to delay the consequences of this disease, and only 30% of patients respond to drug treatment. Alzheimer's is caused by the accumulation of beta-amyloid deposited in neurons and an oxidation process at the neuronal level; for treatment natural therapeutic alternatives is needed. Therefore this paper aims to investigate the evaluation of the neuroprotective effect of two types of extracts of "lepidium meyenii "maca"" *Lepidium meyenii*, determining the optimal concentration to produce the reduction of oxidative stress in the cell line neuroblastoma SH-SY5Y using as a control to 4-nitrophenyl 4-(3-phenoxybenzyl)piperazine-1-carboxylate JZL195 (hydrolase inhibitor fatty acid amide (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL), the major enzymes responsible for the degradation of endocannabinoids) which is used as a treatment of oxidative stress in research.

To induce stress was exposed to the neuroblastoma SH-SY5Y cells to hydrogen peroxide at a concentration of 10 mM, causing significant damage decreasing the viability percentage up to 42.5% of cells. They were evaluated extracts *lepidium meyenii* "maca" Peru and *lepidium meyenii* "maca" Amazon at concentrations 0.2 ppm, 1.0 ppm and 2.0 ppm were evaluated showing that both species exhibit neuroprotective effect by increasing the viability of SH-SY5Y cells to 77.7% and 70.0% respectively when treated with peroxide hydrogen (cellular damage inducing agent). Also the results of both species were evaluated *lepidium meyenii* "maca" with 4-nitrophenyl 4-(3-phenoxybenzyl)piperazine-1-carboxylate JZL195 in which SH-viability of the cells is observed SH5Y 98.4% to the same concentrations of the extracts. Such a comparative study of *lepidium meyenii* "maca"

lepidium meyenii “maca” Peru and Amazon with 4-nitrophenyl 4-(3-phenoxybenzyl)piperazine-1-carboxylate JZL195 shows that both species of lepidium meyenii “maca” do not increase the percentage of viability to levels similar to 4-nitrophenyl 4-(3-phenoxybenzyl)piperazine-1-carboxylate JZL195 to 95% confidence. However it was shown that there is no significant difference between the two lepidium meyenii “maca” to 95% confidence.

**KEY WORDS (oxidative stress, *lepidium meyenii* "maca", Alzheimer's disease, SH-SY5Y neuroblastoma cells)**



## INTRODUCCION

El estrés oxidativo es consecuencia de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS o EROS) y la capacidad de un sistema biológico por detener el daño resultante, produciendo un daño en el ADN, en proteínas o en lípidos provocando muerte neuronal y pérdida de comunicación neuronal.<sup>(1)</sup>

En términos químicos, el estrés oxidativo es un gran aumento en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión. El estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas del oxígeno, que incluyen los radicales libres y los peróxidos. La mayoría de estas especies derivadas del oxígeno se producen en un nivel bajo en condiciones normales de metabolismo aeróbico y el daño que causan a las células es reparado constantemente. Sin embargo, bajo los graves niveles de estrés oxidativo que causa la necrosis, el daño produce agotamiento de ATP impidiendo la muerte celular por apoptosis controlada, provocando que la célula simplemente se desmorone. La fuente más importante de oxígeno reactivo en condiciones normales en organismos aeróbicos es probablemente la pérdida de oxígeno activado de las mitocondrias durante el funcionamiento normal de la respiración oxidativa. Una de las enzimas que produce estrés oxidativo es Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).<sup>(2)</sup>

El estrés oxidativo generado por la producción de especies reactivas del oxígeno puede producir arteriosclerosis, accidentes cerebrovasculares, y la enfermedad de Alzheimer.<sup>(3)</sup>

Hoy en día los resultados *in vivo* e *in vitro* que utilizan modelos de la enfermedad de Alzheimer son cada vez más avanzados sin embargo, sólo unos pocos ensayos clínicos han dado resultados positivos en términos de frenar el deterioro cognitivo.<sup>(4)</sup>

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad degenerativa y progresiva del cerebro donde no existe recuperación, donde dicha enfermedad ataca lentamente las células nerviosas en todas las partes de la corteza del cerebro, así como algunas estructuras circundantes, deteriorando así las capacidades de la persona de controlar las emociones, reconocer errores y patrones, coordinar el movimiento y recordar. Finalmente la persona pierde toda la memoria y funcionamiento mental, siendo hoy en día la cuarta causa

principal de muerte en los adultos y, a menos que se desarrollen métodos eficaces para la prevención y el tratamiento, la enfermedad de Alzheimer alcanzará proporciones epidémicas para mediados del siglo. <sup>(4)</sup>

Dentro del tratamiento del Alzheimer se está considerando como medicina complementaria el uso de *lepidium meyenii* “maca” y la investigación de las propiedades de dicho vegetal. <sup>(4)</sup>

El presente proyecto busca brindar información *in vitro* sobre el efecto neuroprotector de la *lepidium meyenii* “maca” frente al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en células de neuroblastoma SH-SY5Y. <sup>(4)</sup>



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

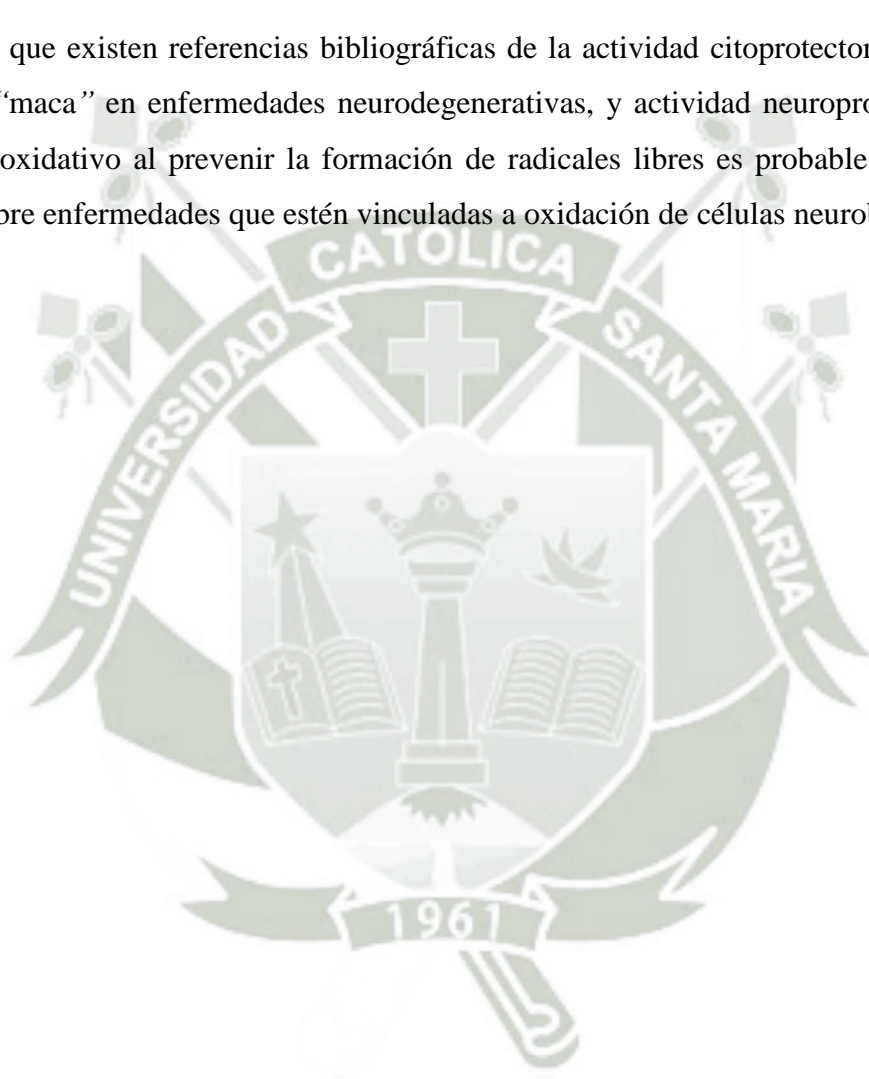
Evaluar el efecto neuroprotector de extracto metanólico de *Lepidium Meyeni* “maca” en estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en células neuroblastomas SH-SY5Y (in vitro).

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Inducir estrés oxidativo en la línea celular neuroblastoma SH-SY5Y usando peróxido de hidrógeno a la concentración 10 .mM
2. Evaluar la viabilidad. Y el efecto neuroprotector de celulas neuroblastomas SH-SY5Y después de haberlas tratado con diferentes concentraciones de lepidium meyenii “maca”.
3. Contrastar el efecto de 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 con el efecto neuroprotector de lepidium meyenii “maca”.
4. Comparar el efecto de lepidium meyenii “maca” de diferente origen.

## HIPOTESIS

Debido a que existen referencias bibliográficas de la actividad citoprotectora de *lepidium meyenii* “maca” en enfermedades neurodegenerativas, y actividad neuroprotectora frente al estrés oxidativo al prevenir la formación de radicales libres es probable que tenga un efecto sobre enfermedades que estén vinculadas a oxidación de células neuroblastomas.



## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

#### 1. *lepidium meyenii* “maca”

El género *lepidium meyenii* “maca” contiene aproximadamente 175 especies. Pertenece a la familia de las crucíferas (*Brassicaceae*). La planta de maca (Ver Figura 1) es conocida en botánica como “*Lepidium meyenii* es característica del cultivo nativo peruano que es comúnmente utilizado por los pueblos andinos. *lepidium meyenii* “maca”” crece exclusivamente en altitudes superiores a 3500 m en los Andes peruanos, en hábitats de luz solar, en frío y fuerte vientos.<sup>(5)</sup>



**Figura 1.** *Lepidium meyenii* (*lepidium meyenii* “maca”) cosechada con la parte aérea y el hipocotilo fresco.

El perfil taxonómico está basado en observaciones morfológicas, aunque de todos los ecotipos de *lepidium meyenii* “maca”, ninguno de ellos tiene semejanza alguna con otras

especies del mismo género. Se ha propuesto el cambio de nombre de esta especie a *Lepidium peruvianum Chacón*; sin embargo, los dos nombres son usados como sinónimos. Las condiciones climáticas de desarrollo para la *lepidium meyenii* “maca” son importantes para la producción de su perfil tanto químico como farmacológico. <sup>(5)</sup> El hipocótilo subterránea es la parte de almacenamiento de la planta de *lepidium meyenii* “maca”. Los hipocótilos pueden diferir en forma, tamaño y color. Estos hipocótilos son de color verde, negro, rojo, oro crema o de color púrpura. (Ver Figura 2) La forma del hipocótilo es esférica con una raíz. <sup>(5)</sup>



**Figura 2.** *lepidium meyenii* “maca”.

El tiempo de cultivo hasta su cosecha demora de ocho meses a un año, posteriormente son expuestos al sol para poder secarse tardando de tres semanas a un mes; pueden ser consumidos hasta después de un año de su conserva. <sup>(5)</sup> Estudios anteriores indican el hipocotíleo *Lepidium Meyenii* (maca) fue consumido desde hace 2000 años por sus propiedades nutricionales y alimenticias en especial por la mejora de fertilidad de animales y humanos sugiriendo una cantidad de consumo por día de 20gr. <sup>(6)</sup>

### 1.1.CLASIFICACION TAXONOMICA

En 1843 Gerhard Walpers realiza la primera descripción científica de la *lepidium meyenii* “maca”, al quedar sorprendido con la facilidad de reproducción de la planta en un hábitat tan extremo. La planta inicialmente, toma el nombre científico de *Lepidium meyenii* Walpers<sup>(7)</sup>

En 1961 la Dra. Gloria Chacón de Popovici, en su Tesis, realiza el primer estudio sobre la *lepidium meyenii* “maca”. En una investigación de la literatura botánica revela que la planta estudiada por el botánico alemán G. Walpers, se asemejaba mucho a la “*Lepidium meyenii chacon*” (maca) con los mismos efectos medicinales crece en partes de Bolivia y Chile <sup>(7)</sup> (Ver Tabla 1)

**TABLA 1.** La siguiente tabla presenta la clasificación taxonómica de *Lepidium meyenii* .

<b>REINO</b>	<b>VAGETAL</b>
<b>DIVISION</b>	fanerogamas
<b>SUBDIVISION</b>	angiospermas
<b>CLASE</b>	dicotiledoneas
<b>ORDEN</b>	archiclamideas
<b>FAMILIA</b>	Rhoedales
<b>GENERO</b>	Brassicaceae
<b>ESPECIE</b>	Lepidium
<b>VARIEDAD</b>	<i>lepidium meyenii</i> .; <i>lepidium peruvianum chacón sp.</i>
<b>NOMBRE COMUN</b>	lepidium meyenii “maca”, huto-huto, ayak willku,pepper wed.

**Fuente:** *lepidium meyenii* “maca” *Planta Medicinal y Nutritiva del Per* <sup>(8)</sup>

## 1.2.REQUERIMIENTOS PARA EL CRECIMIENTO

- **LUZ SOLAR:** Requiere de periodos cortos de luz para el buen crecimiento <sup>(9)</sup>.
- **ALTITUD:** Crece con normalidad entre 3800 y 4800 m.s.n.m, sin embargo la mayoría de los cultivos se encuentran a 3900 y 4100 m de altitud <sup>(9)</sup>.
- **BAJAS TEMPERATURAS:** Se ha reportado que la *lepidium meyenii* “maca” ha soportado heladas nocturnas de -10°C, lo que ha sido posible gracias a su cercanía con formaciones de Ichu que contribuyen a protegerla de frio extremo <sup>(9)</sup>.
- **ALTAS TEMPERATURAS:** Generalmente soporta temperaturas de 18°C, sin embargo ocasionalmente puede resistir 22°C <sup>(9)</sup>.
- **TIPO DE SUELO:** Prefiere suelos de tipo arcilloso y con abundante materia orgánica<sup>(9)</sup>

### Descripción Botánica

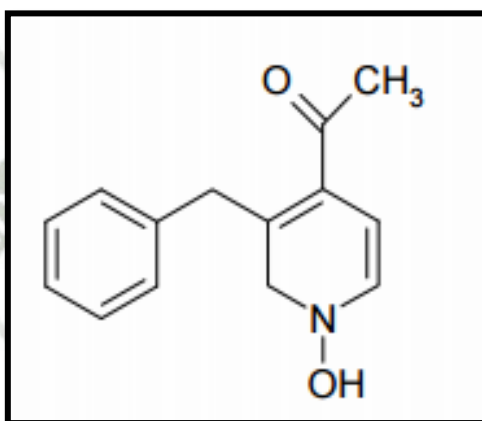
La *lepidium meyenii* “maca” presenta una raíz (hipocotíleo) de forma globosa, redondeada, axonofoma y napiforme, tiene colores variados que van desde el amarillo claro a negro, con un tamaño de 4-5 cm de diámetro transversal y de 5-8 cm de diámetro longitudinal. El tallo principal es reducido, del que nacen varias ramas secundarias <sup>(57)</sup>. Las hojas son arrosetadas, pecioladas y tienen un largo de 6 a 9 cm. La inflorescencia es un racimo compuesto y simple; las flores son perfectas; forman grupos, son axiales y

hermafroditas, actinoformas de color verde claro y pequeñas. El fruto presenta una silicua, ligeramente emarginada, con una sola semilla en cada celda. Ovoide de color amarillento-rojizo y puede medir de 4-5 mm de longitud. La semilla es ovoide y mide 2 mm de longitud. <sup>(9)</sup>

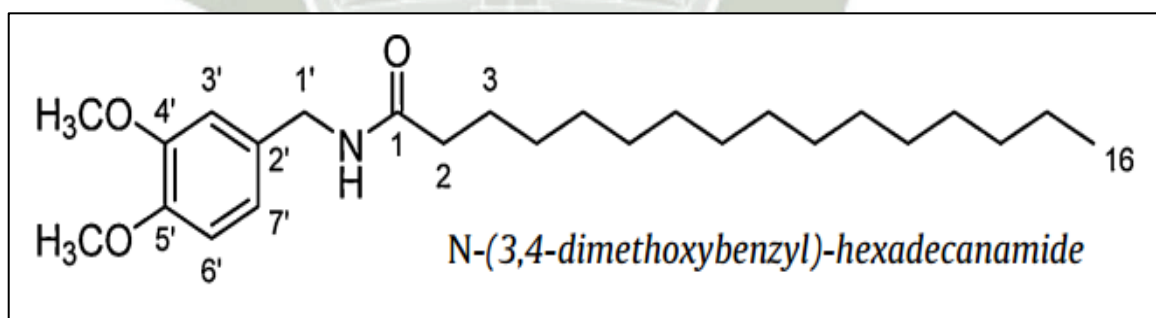
### 1.3.COMPOSICION QUIMICA

#### Compuestos Nitrogenados

Los hipocótilos secos de *lepidium meyenii* “maca” poseen, (Ver Figura 2 ) el derivado benzilado de 1,2 -Dihidro-N-hidroxipiridina, llamada “Lepidium meyenii” macaridina junto con el alcaloide benzilado macamida: N-Benzil-5-oxo – 6E, 8Eoctadecadienamida y N-Benzilhexadecanamida (Ver Figura 3, 4, 5).<sup>(10)</sup>



**Figura 3:** Estructura química de *lepidium meyenii* “maca”ridina  
**Fuente:** Software Chems sketch



**Figura 4.** Estructura de la macamida  
**Fuente:** Software Chems sketch



**Figura 5.** Estructura de la *lepidium meyenii* “maca”  
**Fuente:**Software Chems sketch

Además se encuentran metabolitos secundarios que reportan la presencia de alcaloides, glucocinolatos p-metoxibencil, esteroides y/o triterpenos, compuestos fenólicos, flavonoides y/o cumarinas, taninos, glucósidos, saponinas, aminas alifáticas secundarias, aminas terciarias, almidón, ácidos grasos y aceites naturales. (Ver Tabla 2) <sup>(9)</sup>

La *lepidium meyenii* “maca” contiene gran variedad de vitaminas, encontrándose presentes las vitaminas E y C en gran cantidad, también las vitaminas del complejo B (Ver Tabla 3) <sup>(9)</sup>. La presencia de minerales que contiene la *lepidium meyenii* “maca” hace de esta un excelente revitalizante, conteniendo además de potasio y sodio, minerales que son cofactores enzimáticos del organismo, como son el cobre, magnesio y zinc <sup>(9)</sup>.

Un estudio químico proximal muestra la presencia de aminoácidos y la composición química de la *lepidium meyenii* “maca” (Ver Tablas 4, 5, 6)

**Tabla 2.** “Screening” fitoquímico *lepidium meyenii* “maca”

Saponinas
Terpenoides
Flavonoides
Alcaloides
Dextrinas
Antocianinas

**Tabla 3.** Vitaminas presentes en la *lepidium meyenii* “maca”

VITAMINAS	mg/100ml
Caroteno	0.007
Tiamina (B1)	0.15-117
Riboflavina (B1)	0.31-0.76
Ácido ascórbico	0.80-3.52
Piridoxina (B6)	1.0
Cobalamina (B12)	125.5
Niacina	37.27-43.03

- Estreptomicina

**Tabla 4.** Minerales presentes en la *lepidium meyenii* “maca”<sup>(8)</sup>

<b>MINERALES</b>	<b>mg/100g</b>
<b>Calcio</b>	220
<b>Fosforo</b>	180
<b>Hierro</b>	15.5
<b>Magnesio</b>	0.8
<b>Cobre</b>	5.9
<b>Zinc</b>	3.8
<b>Sodio</b>	18.7

**Tabla 5.** Composición química de *lepidium meyenii* “maca”<sup>(8)</sup>

<b>COMPONENTES PRIMARIOS</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>Humedad</b>	5.00 – 19.62
<b>Proteínas</b>	10.00 – 18.25
<b>Cenizas</b>	3.46 – 6.43
<b>Grasa</b>	0.20 – 2.20
<b>Fibra</b>	3.85 – 8.50
<b>Carbohidratos</b>	51.81 – 76.05

**Tabla 6.** Aminoácidos presentes en la *lepidium meyenii* “maca”<sup>(8)</sup>

<b>AMINOÁCIDO</b>	<b>(mg/g) DE PROTEÍNA</b>
Alanina	63.1
Arginina	99.4
Ácido aspártico	91.7
Glicina	68.3
Ácido glutámico	156.5
Histidina	21.9
Hidroxiprolina	26.0
Leucina	91.0
Lisina	54.5
Metionina	28.0
Fenilalanina	55.3
Prolina	0.5
Sarcosina	0.7
Serina	50.4
Treonina	33.1
Tirosina	30.6
Valina	79.3

## **Estudios de la *lepidium meyenii* “maca” como planta medicinal.**

*lepidium meyenii* “maca” es una planta peruana de la familia Brassicaceae cultivada desde hace más de 2000 años, se utiliza como un suplemento alimenticio y también por sus propiedades medicinales descritas tradicionalmente <sup>(10)</sup>. Pruebas científicas experimentales demostraron que la *lepidium meyenii* “maca” es un energizante nutritivo, presenta propiedades potenciadoras de la fertilidad, y actúa en las disfunciones sexuales, osteoporosis, hiperplasia prostática benigna, la memoria y el aprendizaje, y protege la piel contra la radiación ultravioleta. Los ensayos clínicos demostraron la eficacia de la *lepidium meyenii* “maca” en las disfunciones sexuales, así como aumentar el conteo de espermatozoides y su motilidad. <sup>(10)</sup>. Se hizo una recopilación de varios estudios de la *lepidium meyenii* “maca”, para el tratamiento de los síntomas menopáusicos en mujeres postmenopáusicas <sup>(10)</sup> demostrando resultados de diferentes estudios. En un estudio doble ciego (14 mujeres), para determinar los síntomas de la menopausia en mujeres postmenopáusicas, se reportaron mejorías en la función sexual y en los síntomas psicológicos, como la ansiedad y depresión tras el consumo de *lepidium meyenii* “maca” en comparación con el tratamiento placebo. <sup>(34)</sup> Por otro lado, prueba los efectos de la *lepidium meyenii* “maca”, sobre los síntomas al inicio de la menopausia en mujeres. Fueron reportadas mejorías durante la ingesta de *lepidium meyenii* “maca” en comparación con el placebo <sup>(10)</sup>. Sobre la reproducción sexual masculina, se realizaron varios estudios llegando a diferentes conclusiones; el estudio realizado en animales de experimentación con pulverizado de hipocótilos de *lepidium meyenii* “maca” en diferentes dosis, demostró que el grupo tratado con *lepidium meyenii* “maca” obtuvo una mejoría en la función sexual masculina <sup>(10)</sup>. En relación a las funciones espermatogénicas se vio que la *lepidium meyenii* “maca” también aumenta la movilidad de los espermatozoides, y en cuanto a la función prostática se vio que la *lepidium meyenii* “maca” reduce el peso de la próstata de una manera dosis-respuesta sin ningún cambio en los niveles de testosterona y el peso de la vesícula seminal <sup>(10)</sup>. En cuanto al deseo sexual se realizó una revisión sistemática en seres humanos, y dio un resultado positivo sobre la disfunción sexual o el deseo sexual en mujeres menopáusicas sanas y en hombres adultos sanos <sup>(10)</sup>.

### **Efecto neuroprotector de la *lepidium meyenii* “maca”**

La lipofilicidad de muchos compuestos de la *lepidium meyenii* “maca”, sugirió actividad sobre el sistema nervioso, por este motivo fueron estudiados los efectos sobre el aprendizaje y la memoria en ratas sanas <sup>(11)</sup> y en ratas con problemas de memoria inducida

por escopolamina <sup>(11)</sup>. Se realizaron estudios de la *lepidium meyenii* “maca” en animales de experimentación sobre el aprendizaje y la memoria, mencionando que mejora el aprendizaje y la memoria. <sup>(11)</sup> Estudios realizados por PhD. Alejandro Pino Figueroa, y colaborador en este proyecto, demostraron la actividad neuroprotectora de los extractos de *lepidium meyenii* “maca” *in-vitro*, en neuronas de cangrejo sometidas a estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> <sup>(11)</sup> e *in vivo*, en ratas sometidas a accidente cerebro vascular isquémico. El efecto neuroprotector del extracto pentánico de la *lepidium meyenii* “maca” tiene una respuesta dosis dependiente. En dosis más bajas es benéfico, antioxidante, anti-apoptótico, capaz de proteger a las neuronas del daño isquémico, en cuanto que en dosis mayores presentan actividad pró-apoptótica y muerte celular. <sup>(11)</sup> Se demostró que algunos de los compuestos lipofílicos de la *lepidium meyenii* “maca” podrían actuar a través del sistema cannabinoide en la protección de las neuronas, y oriento nuevas investigaciones sobre los agentes de la *lepidium meyenii* “maca” en la prevención, en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, neuroprotección, y así como también, sobre los mecanismos de acción moleculares, dosis, farmacocinética y toxicidad. <sup>(11)</sup>

## 2. ESTRES OXIDATIVO

Con el transcurso de los años, el individuo comienza a envejecer y esto supone la aparición de cambios irreversibles que afectan a células, tejidos y órganos o a la totalidad del individuo. <sup>(12)</sup>

La vejez no es una enfermedad, aun cuando un cierto número de ancianos desarrolla discapacidades por causa de procesos crónicos originados por el envejecimiento. Muchas de las enfermedades que se asocian con la vejez son enfermedades crónicas las que se adquieren aproximadamente a los 30 años, como es el caso de la artritis, diabetes, enfermedades cardíacas, reumatismo, lesiones ortopédicas, alteraciones mentales y nerviosas. Por lo tanto, el envejecimiento en sí mismo no es una enfermedad y la mayor parte de las personas ancianas gozan de buena salud, aunque no se puede negar que esté acompañado de cambios físicos y que incremente la posibilidad de desarrollar enfermedades crónicas, porque el equilibrio orgánico es más frágil. <sup>(12)</sup>

Algunos de los cambios físicos que aparecen con la edad son: declinación de las funciones sensoriales y perceptivas, disminución de la estatura, propensión a la osteoporosis en las mujeres, atrofia de las glándulas sebáceas del rostro, pérdida de la adaptación al frío y al calor, disminución de la fuerza y la rapidez para realizar actividades físicas, las paredes de

las arterias se endurecen y se reduce su elasticidad y los mecanismos inmunológicos contra de las infecciones y el cáncer pierden eficiencia.<sup>(13)</sup>

Fisiológicamente, el envejecimiento conlleva reducción del agua corporal, de la motilidad intestinal y de la masa renal, así como la función pulmonar pierde la capacidad de reserva. También disminuye la frecuencia cardíaca con el ejercicio y la sensibilidad de los receptores, por lo que pueden producirse síntomas de hipotensión. Se deterioran las diversas modalidades sensoriales: sensibilidad táctil y profunda, visual y auditiva. Neuropsicológicamente puede apreciarse disminución de la memoria próxima, lentificación general de los procesos centrales y pérdida de velocidad en las actividades motoras.<sup>(13)</sup>

De forma general, se considera que el cerebro humano disminuye después de los 50 años, 2% de peso cada década y después de los 60 años se produce un déficit progresivo de neurotransmisores cerebrales; las neuronas dopaminérgicas son las más sensibles a los cambios producidos por el paso del tiempo.<sup>(14)</sup>

Se estima que las personas que sobrepasan los 65 años padecen 2 veces más de discapacidades, 4 veces más de limitaciones, van al médico 42 % más seguido y sus estancias hospitalarias son 50 % más prolongadas.<sup>(15)</sup>

Existe una teoría denominada modelo de daños acumulados que trata de explicar el envejecimiento. Este modelo sugiere que las células acumulan daños poco a poco y no se pueden reparar después de muchos años. Esto, unido a que el sistema inmunológico de las personas mayores disminuye y el sistema de reparación de ADN decrece con los años, es decir que las células mutantes se acumulan en el ADN mitocondrial y nuclear, y pueden llevar a la síntesis de proteínas anormales.<sup>(15)</sup>

Sobre este modelo, aparece otro relacionado con los radicales libres, el cual plantea que las mutaciones y los daños que se acumularon con los años pueden ser debido al proceso de convertir oxígeno en energía lo que conlleva a la formación de radicales libres. Cuando estas moléculas se hacen en cantidades normales, ayudan a mantener el cuerpo saludable con la eliminación de toxinas. Sin embargo, cuando se producen en grandes cantidades, hacen daño al cuerpo y puede resultar en la muerte celular y otros daños (estrés oxidativo). (Desde el punto de vista molecular, los radicales libres actúan como potentes agentes

oxidantes y son causa de envejecimiento al combinarse con moléculas esenciales, como el ADN y proteínas, a las cuales desactivan.<sup>(15)</sup>

Los aldehídos, también un producto oxidativo, producen anclajes en el colágeno y otras macromoléculas, y determinan una pérdida de la flexibilidad de los tejidos. Dado que el colágeno desempeña un papel decisivo en el transporte e intercambio de elementos entre las células, las modificaciones de su estructura física deterioran profundamente las funciones fisiológicas en el organismo.<sup>(15)</sup>

En el nivel celular los cambios atribuidos al envejecimiento pueden considerarse consecuencia de un programa genético, dado que el desarrollo y la maduración biológicos parecen estar controlados por señales procedentes de ciertas estructuras profundas (ADN, ARN), por lo que el fracaso celular o de las funciones de ciertos órganos en determinado momento se debería a una programación prefijada.<sup>(15)</sup>

Respecto a los órganos se han desarrollado diversas teorías que hacen referencia a las modificaciones que la edad puede producir en los sistemas de autoinmunidad, los cuales disminuirían su eficacia con el paso del tiempo, a la vez que darían origen a la formación de anticuerpos que actuarían contra las propias células. En resumen, el envejecimiento supone: Disminución de las capacidades de reserva de sistemas y órganos, del control homeostático, y disminución de la adaptación a agresiones del entorno.<sup>(15)</sup>

## **2.1. Envejecimiento y estrés oxidativo**

El envejecimiento y la disminución de la longevidad se debe en parte a la acción de los radicales libres encargados de diversas reacciones de oxidación enzimática. Los radicales libres de oxígeno son altamente reactivos y todas las células pueden ser lesionadas por los mecanismos siguientes:

1. Alteraciones oxidativas acumuladas en el colágeno, la elastina y el DNA.
2. Ruptura de mucopolisacáridos mediante la degradación oxidativa.
3. Acumulación de sustancias metabólicamente inertes, como ceras y pigmentos, y fibrosis de arteriolas capilares.<sup>(16)</sup>

Según estos mecanismos metabólicos, la expectativa de vida depende de la lentificación en el consumo de oxígeno. Complejas reacciones bioquímicas han sido descritas en el cuerpo humano, estando estas controladas por múltiples mecanismos de regulación. Muchas de las

reacciones bioquímicas implican transferencia y liberación de energía, que pueden acarrear formación de radicales libres, sin embargo estos deben ser cuidadosamente controlados porque dada su naturaleza altamente reactiva representan una amenaza potencial para los tejidos sanos.<sup>(17)</sup>

El incremento del estrés oxidativo puede resultar de un aumento en la producción de precursores de radicales de oxígeno reactivo, de un aumento de las especies reactivas del oxígeno (EROs o ROS), de un incremento de las catálisis prooxidantes, de una reducción de los sistemas antioxidantes o de una combinación de todos ellos.<sup>(18)</sup>

Las especies reactivas de oxígeno presentan una alta reactividad tanto que son capaces de reaccionar con una amplia gama de estructuras celulares. Se conoce que sus blancos fundamentales son los ácidos grasos insaturados de las membranas fosfolipídicas, proteínas y ácidos nucleicos. Estas especies, altamente reactivas, una vez formadas dan lugar a una serie de reacciones en cadena (peroxidación lipídica, glicosilación) que pueden dañar todas las moléculas de importancia biológica ya sea por una alteración directa de la estructura y función o por el incremento de la función enzimática.<sup>(19)</sup>

Existen numerosas reacciones enzimáticas que sirven como fuente de radicales libres entre las que se encuentran: las implicadas en la cadena respiratoria, en la fagocitosis o en la síntesis de las prostaglandinas. También se producen radicales libres en reacciones no enzimáticas entre el oxígeno y los compuestos orgánicos y como consecuencia de las radiaciones ionizantes.<sup>(19)</sup>

El envejecimiento por la intervención de los radicales libres se debe a: Incremento en la velocidad de consumo del oxígeno en la mitocondria, lo cual disminuye su longevidad, a la intervención de los radicales libres en el desarrollo de ciertas enfermedades (cáncer, aterosclerosis y alzheimer).<sup>(20)</sup>

Con el desarrollo de la vejez, las acciones de las especies reactivas de oxígeno y de otros radicales son mucho más perjudiciales, porque con el envejecimiento los sistemas antioxidantes se ven disminuidos y por tanto existe una mayor probabilidad de que las especies radicalarias ejerzan su acción sobre sus moléculas blancas. A continuación se mencionan algunas acciones biológicas de los radicales libres de oxígeno sobre moléculas de importancia biológica, las cuales se agravan con la vejez.<sup>(20)</sup>

## 2.2. Acciones biológicas de los radicales libres de oxígeno (ROS)

Las especies reactivas del oxígeno, muy especialmente el radical hidroxilo, son altamente reactivas, y pueden dar lugar a reacciones secundarias útiles o nocivas con muchas sustancias presentes en el organismo o extraorgánicas (fagocitosis de organismos invasores). Son los productos finales de estas reacciones secundarias los que producirán los mayores efectos de citotoxicidad. <sup>(21)</sup>

Los radicales libres ejercerán sus efectos en función de su concentración, localización y del estado de su sistema neutralizador. <sup>(21)</sup>

- Acciones sobre los glúcidos

Los monosacáridos y disacáridos resisten la acción de los radicales libres de oxígeno. La glucosa constituye un almacenador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. El ácido hialurónico es atacado y fragmentado por el radical superóxido. Los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres. <sup>(21)</sup>

En la diabetes, enfermedad que puede aparecer con el paso de los años, se produce un aumento de la concentración de glucosa en la sangre, que puede ocasionar que esta sufra una autooxidación o que se entrecruce con las proteínas presentes en el suero (glicosilación de proteínas) para dar lugar a una serie de estructuras altamente reactivas (compuestos de Amadori), así como también a especies reactivas del oxígeno, las cuales desempeñan un papel importante en el desencadenamiento de la enfermedad y en el desarrollo de los diversos estados fisiopatológicos que la acompañan. <sup>(21)</sup>

- Acciones sobre los lípidos

La acción de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados, lo que provoca su peroxidación que deriva en consecuencias como: pérdida de la flexibilidad y de las funciones secretoras, ruptura de los gradientes iónicos transmembrana. <sup>(21)</sup>

La reacción de peroxidación puede iniciarla el radical hidroxilo, el radical hidroperoxil. El radical libre extrae un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena del ácido graso y deja un electrón no apareado, con lo cual se genera un radical lipídico. Este radical lipídico rápidamente sufre un reordenamiento molecular para producir un dieno conjugado, que reacciona con el oxígeno molecular y produce un radical hidroperoxil. <sup>(21)</sup> Este radical puede a su vez extraer un átomo de hidrógeno de un carbono metileno de otro ácido graso poliinsaturado para formar un nuevo radical lipídico y un hidroperóxido lipídico. El radical lipídico entonces se combina con otra molécula de oxígeno y continúa la reacción en cadena. <sup>(21)</sup>

. El hidroperóxido lipídico es un componente estable hasta que se pone en contacto con iones metálicos de transición, entonces se producen más radicales, que a su vez posteriormente inician y propagan otra cadena de reacciones. <sup>(21)</sup>

Los productos finales de este proceso de peroxidación lipídica son aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, incluido el malondialdehído. Estos productos de degradación pueden difundir lejos del sitio de las reacciones y producir edema celular, además de influir sobre la permeabilidad vascular, inflamación y quimiotaxis.

Asimismo, pueden alterar la actividad de fosfolipasas e inducir la liberación de ácido araquidónico, con la subsiguiente formación de prostaglandinas y endoperóxidos. <sup>(21)</sup>

El malondialdehído, a su vez, puede reaccionar con lípidos y proteínas durante la peroxidación lipídica para formar bases de schiff conjugadas, productos fluorescentes insolubles que se acumulan en el interior de los lisosomas y forman el pigmento de envejecimiento conocido con el nombre de lipofucsina (reconocido marcador morfológico de envejecimiento porque se acumula en los tejidos con la edad). <sup>(21)</sup>

- Acciones sobre las proteínas

La acción de los radicales libres de oxígeno sobre las proteínas se ejerce sobre los enlaces insaturados, los anillos aromáticos y los grupos tiol. De esta forma, proteínas ricas en determinados aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína) pueden sufrir modificaciones estructurales y funcionales. Los grupos sulfhidrilo pueden ser transformados en puentes disulfuro, lo que produce la inactivación enzimática. En otros casos, como el colágeno, las fibrillas se pueden romper por el radical superóxido e

hidroperóxido, proceso que puede constituir el punto de partida para la acción de proteasas y facilitar la pérdida de la estructura de la triple hélice de colágeno.<sup>(21)</sup>

En el caso de las hemoproteínas, como la oxihemoglobina, el radical superóxido o el peróxido de hidrógeno pueden reaccionar con el hierro para formar metahemoglobina y otros productos de oxidación

Otra importante hemoproteína, la catalasa, es inhibida por el radical superóxido; y el peróxido de hidrógeno producto de la dismutación del radical superóxido puede inhibir la superóxido dismutasa citosólica (cobre-zinc dependiente).<sup>(21)</sup>

En presencia de ciertas peroxidasas (con grupo hemo) el peróxido de hidrógeno es capaz de oxidar halogenuros como el ion cloruro, dando ácido hipocloroso, compuesto extremadamente tóxico para bacterias, virus y células.

El ácido hipocloroso puede reaccionar con aminas, y dar lugar a las cloraminas, más lipofílicas y las probables responsables directas de la toxicidad celular.

Un mecanismo semejante lo produce el peróxido de hidrógeno con el ion tiocianato que da lugar a oxitiocianato, potentísimo bactericida.<sup>(21)</sup>

El efecto de los radicales libres de oxígeno sobre una determinada proteína depende de su composición en aminoácidos, de la importancia y localización de los aminoácidos que median la conformación y actividad de la proteína, así como de la posibilidad de reparación de la lesión.<sup>(21)</sup>

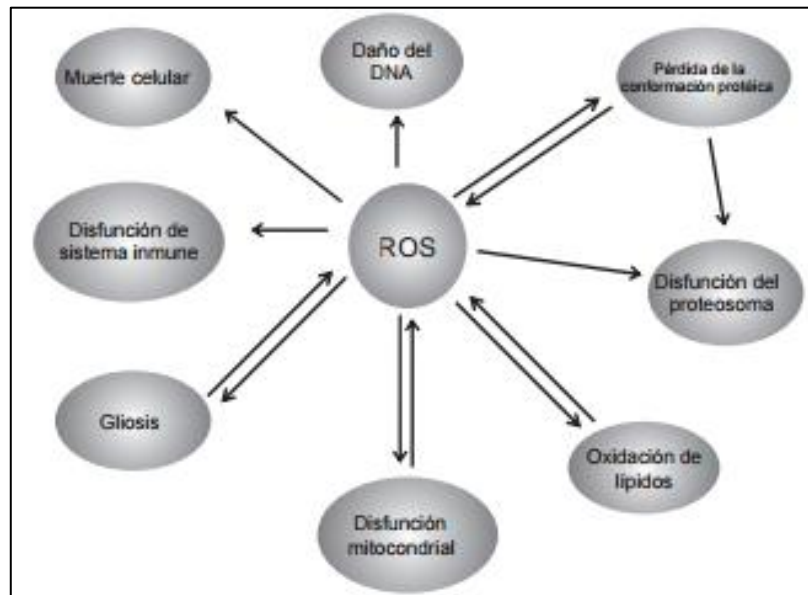
La localización celular de las proteínas y la naturaleza de la amenaza de los radicales libres también influye sobre la extensión del daño proteico.<sup>(35)</sup>

- *Acciones sobre los ácidos nucleicos*

Los efectos observados en los ácidos nucleicos por los radicales libres de oxígeno son por causa de fenómenos de hidroxilación de bases nitrogenadas, escisión de hebras de ADN y formación de uniones cruzadas.<sup>(21)</sup>

Esto ocasiona alteraciones en la duplicación y transcripción, que explican la asociación de la generación de radicales libres de oxígeno con la carcinogénesis y el envejecimiento.<sup>(21)</sup>

Se ha propuesto además que la ruptura que causan las EROs sobre el ácido desoxirribonucleíco (ADN) activa a las poli (ADP-ribosa) sintetasa, las que eliminan el NAD<sup>+</sup> celular, 18 cofactor necesario para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en la ruta glucolítica, de manera que se produce la inhibición de la glicólisis y de los componentes de la cadena transportadora de electrones al nivel mitocondrial; por lo tanto disminuye el ATP intracelular. (Ver Figura 6) <sup>(21)</sup>



**Figura 6:** Efecto de las especies reactivas en el cerebro

### 2.3. Antioxidantes

Todos los seres vivos que utilizan el oxígeno para obtener energía, liberan radicales libres, lo cual es incompatible con la vida a menos que existan mecanismos celulares de defensa que los neutralice. A estas defensas se les denomina antioxidantes y se pueden clasificar en endógenos o en exógenos. <sup>(22)</sup>

Dentro de los antioxidantes endógenos se encuentran 3 enzimas que son fundamentales en esta actividad; la catalasa, la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa <sup>(22)</sup>.

La catalasa es una hemoproteína tetramérica que presenta hierro en su núcleo, está localizada en los peroxisomas, con una doble actividad (catalasa y peroxidasa), la cual cataliza la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno. La SOD cataliza la disminución del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno. <sup>(22)</sup>

La glutatión peroxidasa se encarga de la reducción de hidroperóxidos intracelulares, peróxido de hidrógeno, grandes moléculas de peróxidos lipídicos procedentes del ataque de los radicales libres de oxígeno sobre los lípidos poliinsaturados de las membranas y sobre productos derivados de las reacciones catalizadas por la enzima lipooxigenasa. La glutatión peroxidasa es una proteína tetramérica que posee 4 átomos de selenio y necesita como sustrato esencial al glutatión, el cual es capaz de conjugarse con compuestos potencialmente tóxicos, solubilizar y facilitar su excreción biliar. Por esta razón, es importante mantener niveles altos de glutatión, lo cual puede facilitarse mediante la ingesta de aminoácidos sulfurados (metionina, cisteína).<sup>(22)</sup>

Cabe destacar la acción de la enzima mitocondrial citocromo-oxidasa, la cual favorece la reducción tetravalente del oxígeno molecular para formar agua, sin formación de radicales libres de oxígeno.<sup>(22)</sup>

Dentro de los antioxidantes exógenos se encuentran las vitaminas E y C, los betacarotenos, los flavonoides y los licopenos, los cuales se incorporan al organismo mediante la dieta.<sup>(22)</sup>

La vitamina E está constituida por varios tipos de compuestos naturales, de los cuales el *α*-tocoferol tiene la mayor actividad biológica (antioxidante y estabilidad de las membranas). Se calcula que cada molécula de vitamina E es capaz de proteger 500 moléculas de fosfolípidos. Representa la principal defensa contra el daño oxidativo de la membrana en los tejidos humanos. Posee un papel protector frente a los daños asociados a los radicales libres de oxígeno involucrados en procesos como el cáncer, el envejecimiento, las alteraciones cardiocirculatorias, la artritis y el ejercicio intenso. Está presente en el medio extracelular y por su carácter liposoluble se localiza en la membrana celular reaccionando con mayor efectividad sobre el radical superóxido, hidroxilo y radicales peroxil lipídicos para formar especies menos reactivas. Su acción plasmática se ve incrementada por el ascorbato y los uratos séricos.<sup>(22)</sup>

Los betacarotenos son precursores metabólicos de la vitamina A que actúan de forma independiente en diversas funciones celulares. La vitamina C es hidrosoluble y participa en el metabolismo intermediario y oxidativo, en la reabsorción de hierro y es necesaria para la respuesta inmune.<sup>(23)</sup>

Además de las vitaminas, los oligoelementos como el cobre, el zinc, el manganeso, el selenio y el hierro son necesarios incorporarlos al organismo a través de la dieta, porque conforman la parte activa del núcleo de las enzimas antioxidantes.<sup>(23)</sup>

Con el envejecimiento, los niveles tisulares de antioxidantes que se producen de forma natural como las vitaminas E y C, el glutatión y la catalasa se reducen y por lo tanto, el estado antioxidante total esta disminuido, por causa entre otros factores de los daños acumulados por los radicales libres con los años. Es por eso que se necesita de una mayor ingestión de compuestos antioxidantes durante esta etapa de la vida.<sup>(23)</sup>

Muchos estudios han demostrado que un aporte suplementario de antioxidantes reduce la incidencia de ciertas enfermedades y mejora el estado de salud de los ancianos. La terapia con antioxidantes puede no solo ofrecer un tratamiento efectivo contra la progresión de las enfermedades, sino que puede reducir los efectos secundarios asociados a muchos de los tratamientos que se aplican en la actualidad contra diversas enfermedades y contribuir así con la calidad de vida de las personas.<sup>(23)</sup>

En conclusión el estrés oxidativo es causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS o ERO) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño resultante. En términos químicos, el estrés oxidativo es un gran aumento en la reducción del potencial celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares REDOX celulares como el glutatión. El estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis. (Ver Figura 7)<sup>(23)</sup>

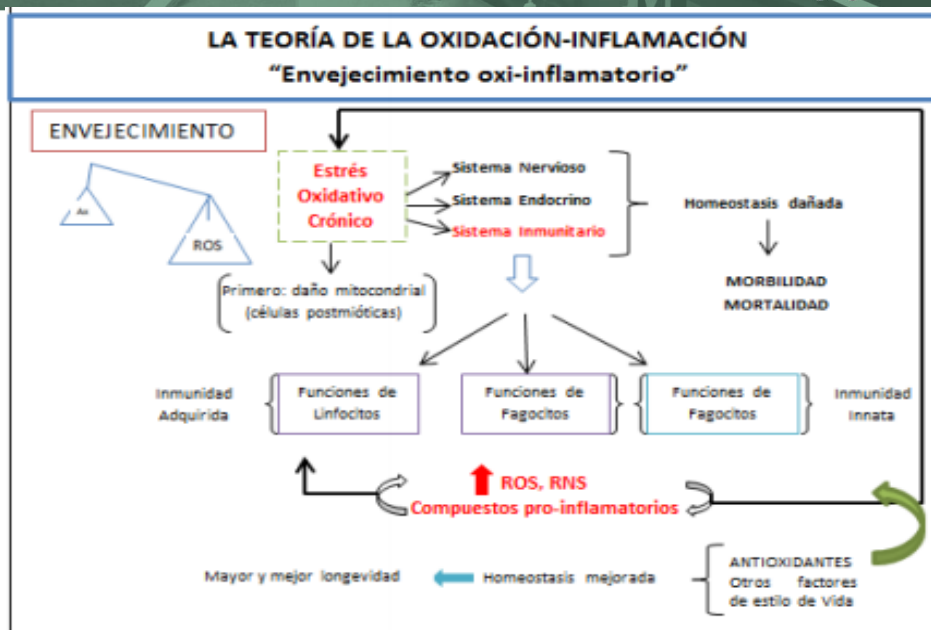


Figura 7: TEORÍA DE ENVEJECIMIENTO <sup>(23)</sup>

Todas las formas de vida mantienen un entorno reductor dentro de sus células. Este entorno reductor es preservado por las enzimas que mantienen el estado reducido a través de un constante aporte de energía metabólica. <sup>(24)</sup>

Desbalances en este estado normal REDOX pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. Los radicales libres tienen una configuración electrónica de capas abiertas por lo que llevan al menos un electrón desapareado que es muy susceptible de crear un enlace con otro átomo o molécula. Un aspecto particularmente destructivo del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas del oxígeno, que incluyen los radicales libres y los peróxidos. <sup>(24)</sup>

### 3. LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

De acuerdo con un artículo publicado por “el mundo.es”, fue en 1907 que descubrió la enfermedad que producía pérdida de memoria, desorientación, alucinación y muerte. Una enfermedad diagnosticada por primera vez en una mujer de 51 años, quien había perdido repentinamente el conocimiento de las cosas. El cerebro fue estudiado por Alzheimer, quien descubrió un número disminuido de neuronas en la corteza cerebral, junto con cúmulos de proteínas, unos ovillos o filamentos neurofibrilares en el citoplasma de las neuronas. <sup>(25)</sup>

“Enfermedad de Alzheimer”, en honor de su descubridor, fue el nombre que adoptó esta patología. Alzheimer fue nombrado en 1912 profesor ordinario de Psiquiatría y director de la clínica de la Universidad de Breslau. Falleció el 19 de diciembre de 1915, a la edad de 51 años a causa de una endocarditis. <sup>(25)</sup>

De acuerdo a cifras del Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas, alrededor de 300 000 compatriotas sufren de La enfermedad de Alzheimer .Esta enfermedad severa afecta al cerebro de tal manera que, en un estado avanzado, ocasiona consecuencias irreversibles como la pérdida de memoria, desorientación temporal o espacial y el deterioro de la capacidad intelectual. <sup>(25)</sup>

La enfermedad de Alzheimer (EA), es un trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad, está caracterizada clínicamente por la pérdida progresiva de la memoria y las funciones cognitivas, lo cual resulta en una demencia severa. La EA es la causa más común de demencia en personas mayores de 60 años. Neuropatológicamente, la EA se define por la acumulación de dos tipos de material fibroso: el péptido  $\beta$ -amiloide extracelular depositado en las placas seniles y las marañas neurofibrilares intracelulares. Las marañas neurofibrilares están presentes en regiones correspondientes al hipocampo y la corteza cerebral. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la patogénesis de la EA, entre las que incluyen: la cascada amiloide, estrés oxidativo e inflamación. Varias líneas de investigación han implicado al estrés oxidativo y daño por radicales libres en la etiología y patogénesis de la EA. Este daño incluye una asociación de defectos en el metabolismo energético y la compensación de las enzimas antioxidantes. Desde hace algunos años, las investigaciones se han centrado en los defectos de la cadena respiratoria mitocondrial para dilucidar el papel de las mutaciones en el DNA mitocondrial y de la combinación de la expresión de genes de DNA nuclear y mitocondrial. Hay estudios que reportan la presencia de glicosilación en las marañas neurofibrilares y en las placas seniles, modificaciones lipoxidativas en proteínas, modificaciones en neurofilamentos inducidas por grupos carbonilo y nitrotirosina en neuronas hipocampales con EA. <sup>(26)</sup> También se reportaron estudios que indican la presencia de un estado de estrés oxidativo regionalizado en cerebros con EA, sobre las bases de una cuantificación de daño en proteínas y DNA. Más aún, existen evidencias de un incremento en la oxidación de RNA y peroxidación de lípidos en la EA. El peróxido de hidrógeno, una de las especies reactivas clave como mediadora de estrés oxidativo, es generada durante la agregación de las proteínas amiloides asociadas a algunas enfermedades neurodegenerativas. El peróxido de hidrógeno

es catalíticamente convertido en el radical hidroxilo altamente agresivo en presencia de Fe(II) y Cu(I), el cual vuelve a las proteínas amiloidogénicas ( $\beta$ -amiloides y  $\alpha$ -sinucleína) vulnerables al ataque por el radical hidroxilo. <sup>(26)</sup>

En algunas experimentaciones de cerebros de roedor tratadas con péptido  $\beta$ -amiloide también llevan a la modificación oxidativa, lo cual sugiere una relación directa entre el estrés oxidativo mediado por  $\beta$ -amiloides y un mecanismo potencial de neurodegeneración. Esta evidencia apoya la idea de que las modificaciones oxidativas llevan a una pérdida de la funcionalidad. A pesar de la amplia documentación de daño oxidativo en la EA, las fuentes del incremento de ROS responsables de iniciar dicho daño aún permanecen poco claras. <sup>(27)</sup>

Los factores de riesgo para esta enfermedad pueden ser, entre otros: Presión arterial alta por mucho tiempo, antecedentes de traumatismo craneal. Niveles altos de homocisteína (un químico corporal que contribuye a enfermedades crónicas como la cardiopatía, la depresión y posiblemente la enfermedad de Alzheimer) Pertenecer al género femenino; debido a que las mujeres generalmente viven más que los hombres, tienen mayor probabilidad de desarrollar esta enfermedad. <sup>(27)</sup> Que exista un historial médico de demencia o de síndrome de Down en la familia. <sup>(28)</sup>

La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno degenerativo progresivo, irreversible que implica el proceso de sinapsis y en neuronas. EA conduce a una disminución gradual de la memoria y las funciones cognitivas, y por lo tanto a la muerte prematura del paciente. EA se caracteriza por alteraciones neuropatológicas incluyen la deposición de placas amiloides y un aumento de estrés oxidativo en las células. El resultado final de la enfermedad es la pérdida de sinapsis y neuronas. <sup>(28)</sup>

En cuanto a su diagnóstico no existe una sola prueba diagnóstica para la Enfermedad de Alzheimer. Se debe obtener una evaluación física, psiquiátrica y neurológica completa: Examen médico detallado Pruebas neuropsicológicas. Pruebas de sangre completas. Electrocardiograma - Electroencefalograma. - Tomografía computarizada. <sup>(29)</sup>

No existe cura para la enfermedad de Alzheimer. Los objetivos del tratamiento son: Disminuir el progreso de la enfermedad Manejar los problemas de comportamiento, confusión y agitación Modificar el ambiente del hogar apoyar a los miembros de la familia y otras personas que brindan cuidados. <sup>(29)</sup> Ciertas vitaminas ayudan al mantenimiento de

las funciones cognitivas en estos pacientes como vitaminas B12, B6, Ácido fólico.<sup>(30)</sup> Se ha probado la eficacia de fármacos anticolinesterásicos que tienen una acción inhibitoria de la colinesterasa, la enzima encargada de descomponer la acetilcolina, el neurotransmisor que falta en la enfermedad de Alzheimer y que incide sustancialmente en la memoria y otras funciones cognitivas. Con todo esto se ha mejorado el comportamiento del enfermo en cuanto a la apatía, la iniciativa y la capacidad funcional y las alucinaciones, mejorando su calidad de vida. El primer fármaco anticolinesterásico comercializado fue la tacrina, hoy no empleada por su hepatotoxicidad. Existen tres tipos de medicamentos que actualmente están aprobados por la FDA para tratar los síntomas cognitivos de la enfermedad de Alzheimer. El primer tipo, los inhibidores de colinesterasa, evita la descomposición de la acetilcolina, un mensajero químico importante para la memoria y el aprendizaje. Al mantener niveles altos de acetilcolina, estos medicamentos permiten la comunicación entre las células nerviosas. Se recetan generalmente tres inhibidores de la colinesterasa: Donepezilo (Aricept), aprobado en 1996 para tratar la etapa leve a moderada de la enfermedad de Alzheimer y, en 2006, para la etapa severa. Rivastigmina (Exelon), aprobado en 2000 para tratar la etapa leve a moderada de la enfermedad de Alzheimer. Galantamina (Razadyne), aprobado en 2001 para tratar la etapa leve a moderada. El segundo tipo de medicamento funciona mediante la regulación de la actividad de glutamato, un mensajero químico diferente que interviene en el procesamiento de información: Memantine (Namenda), aprobado en 2003 para las etapas de moderada a severa, es el único medicamento disponible en esta clase. El tercer tipo es una combinación de un inhibidor de colinesterasa y de un regulador de glutamato. Donepezilo y memantina (Namzaric) aprobado en 2014 para la etapa moderada y la etapa severa. La eficacia de estos tratamientos varía según la persona. A pesar de que pueden ayudar a tratar los síntomas por un tiempo, no desaceleran ni detienen los cambios cerebrales que causan el agravamiento de la enfermedad de Alzheimer.<sup>(30)</sup>

Presentan un perfil de eficacia similar con parecidos efectos secundarios: alteraciones gastrointestinales, anorexia y trastornos del ritmo cardiaco, infecciones del tracto urinario, neumonía, infecciones del oído o los senos paranasales que llegan a causar mareos y dolor.<sup>(68)</sup>

### 3.1. ETAPAS DE LA ENFERMEDAD

Típicamente, la enfermedad de Alzheimer progresa lentamente en tres etapas: temprana (leve), moderada (intermedia) y avanzada (severa). Después del diagnóstico, quienes padecen de la enfermedad de Alzheimer viven un promedio de cuatro a ocho años. Sin embargo, algunos pacientes pueden vivir hasta 20 años.<sup>(31)</sup>

Los cambios en el cerebro debidos al Alzheimer empiezan años antes de los primeros síntomas. Esta etapa de tiempo, la cual puede durar años, se le refiera como enfermedad de Alzheimer preclínico.<sup>(31)</sup>

Las siguientes etapas proveen un guía general de como las habilidades cambian en cuanto los síntomas empiezan aparecer. Las etapas coinciden en parte, lo cual dificulta colocar a la persona con el Alzheimer en una etapa específica.<sup>(31)</sup>

Etapa temprana (leve) es posible que la persona con la enfermedad de Alzheimer funcione independientemente. Tal vez aún pueda conducir un auto, trabajar e involucrarse en actividades sociales.<sup>(31)</sup>

A pesar de esto, la persona puede sentir que está experimentando lagunas en la memoria, como olvidar palabras conocidas o la colocación de objetos comunes de la vida cotidiana.<sup>(72)</sup> La familia, los amigos, o los colegas empiezan noten dificultades. Durante una entrevista medica detallada, el médico puede detectar problemas con la memoria o la concentración.<sup>(31)</sup>

Etapa moderada (intermedia) es la más larga a medida que la enfermedad progresa, los que padecen del Alzheimer requieren un nivel de cuidado más alto. Usted puede notar que la persona confunde las palabras, tiene dificultades para abotonarse una camisa, se siente frustrada o enojada, o actúa de manera desconcertante, como, por ejemplo, negarse a bañarse.<sup>(31)</sup>

El daño a las células del cerebro dificulta la expresión de pensamientos y cumplir con tareas rutinias.<sup>(31)</sup> Los síntomas que comenzaron a manifestarse en la etapa temprana, ahora se vuelven más notorios y pueden incluir:

Etapa avanzada (severa) la etapa final de la enfermedad, las personas pierden la capacidad de responder al entorno, sostener una conversación y, finalmente, controlar el movimiento. Las personas aún pueden decir palabras o frases, pero comunicar el dolor se vuelve más difícil.<sup>(71)</sup> De manera que la memoria y las destrezas cognitivas continúan a disminuir, es

posible que se presenten cambios significativos en la personalidad y que las personas necesiten un nivel considerable de ayuda con las actividades cotidianas. Ser aumenta la vulnerabilidad a infecciones, especialmente la neumonía. <sup>(25)</sup>

El impacto en las personas que padecen de Alzheimer Debido a los cambios en el cerebro, las personas con Alzheimer eventualmente perderán el sentido de quiénes son y la habilidad de cuidarse ellos mismos. La enfermedad afecta la independencia de la persona, las relaciones interpersonales y la habilidad de expresarse. Las personas más jóvenes que padecen de la enfermedad pueden confrontar otros problemas. <sup>(25)</sup>

El impacto en los cuidadores Millones de familias actualmente confrontan el enorme impacto físico, emocional y económico que conlleva cuidar a un ser querido con Alzheimer. El setenta por ciento de las personas con Alzheimer viven en sus hogares, donde sus familias y amigos proveen la mayor parte del cuidado y costean los gastos. <sup>(26)</sup>

El impacto en la sociedad de la enfermedad de Alzheimer tiene un impacto enorme en la sociedad. Los gastos relacionados con los servicios de salud y cuidado a largo plazo para personas que viven con (EA) y demencia ascenderán a 183 billones de dólares

Los individuos con (EA) u otros tipos de demencia son usuarios frecuentes de centros de cuidado a largo plazo y hospicios. Los gastos para estos tipos de cuidados son casi tres veces más altos para personas mayores con (EA)r u otras demencias que para personas mayores que no sufren de la enfermedad. <sup>(26)</sup>

#### **4. AVANCES DE INVESTIGACION**

Debido a el estudio de efectos adversos del tratamiento y al importante y preocupante impacto en la sociedad respecto al Alzheimer, plantas y derivados de plantas han sido considerados como alternativas importantes en el tratamiento de condiciones neurodegenerativas. Las principales acciones que se encuentran en drogas naturales a base de productos son la reducción del estrés oxidativo, la estabilización de las membranas celulares, inactivación de enzimas, la inhibición de la apoptosis e inflamación, y una estabilización general de las células para prevenir muerte. <sup>(27)</sup>

La búsqueda de nuevos fármacos neuroprotectores eficaces ha incluido medicinas complementarias y alternativas. Las plantas medicinales tienen la gran ventaja de haber sido evaluadas en ensayos clínicos durante siglos. Además las plantas han sido

importantes fuentes de compuestos químicos a ser utilizados como medicamentos o para guiar la síntesis de nuevos fármacos.

De forma natural los compuestos tienen la ventaja de haber sido desarrollado en los organismos vivos durante el curso de la evolución para protegerlos y para mejorar su supervivencia.<sup>(27)</sup>

Las raíces (hipocotilos) de *lepidium meyenii* “maca” podría tener diversas propiedades beneficiosas para la salud frente al estrés oxidativo, estabilizar membranas, inactivar enzimas, inhiben la apoptosis o inflamación, e inhibir o reducir la lesión neuronal observado en patologías neurodegenerativas agudas tales como accidente cerebrovascular isquémico focal o lesión cerebral traumática, y otras enfermedades neurodegenerativa.<sup>(27)</sup>

## 5. CULTIVO CELULAR

Actualmente las investigaciones se desarrollan en base al estudio de células específicas o grupos celulares en plantas y animales, por lo cual muchas investigaciones conducen a estudios sobre células aisladas que hoy en día se conoce como cultivo celular.<sup>(32)</sup>

Los cultivos celulares poseen diversas ventajas como la obtención de células de organismos de un único tipo específico con propiedades homogéneas, por otro lado las condiciones experimentales pueden controlarse mejor en un cultivo que en un organismo intacto y por último una única célula puede ser cultivada en un tiempo muy corto hasta formar una colonia de muchas células idénticas.<sup>(32)</sup>

Para desarrollar cultivos celulares es necesario tener en cuenta que estos varían de acuerdo al tipo de célula a cultivar, ya que en un medio artificial en el cual las células son cultivadas en un envase que debe contener un sustrato o medio que proporcione los nutrientes esenciales como aminoácidos, carbohidratos, vitaminas y minerales. Otros puntos a considerar son factores de crecimiento, hormonas y gases como  $O_2$  o  $CO_2$  y la regulación de las condiciones físico químicas como pH, presión osmótica y temperatura. (Ver Figura 8).<sup>(32)</sup>



*Figura 8.* Cultivo celular

## 5.1. ESTADOS DEL CULTIVO CELULAR

### -Cultivo primario

El cultivo primario refiere al estado del cultivo después que las células son aisladas del tejido y proliferan bajo condiciones específicas. Para su preparación se deben romper las interacciones entre células y matriz, para ello los fragmentos de tejidos son tratados con una combinación de una proteasa (tripsina) y un quelante conocido (EDTA) que disminuye la presencia de iones metálicos como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  del medio. Finalmente las células liberadas son trasladadas en placas con un medio rico en nutrientes y suero, donde pueden adherirse entre sí a la superficie. <sup>(33)</sup>

### -Pasaje celular

Las células adherentes crecen en una monocapa hasta que tengan buena confluencia. La cinética del crecimiento celular *in vitro* presenta una etapa de latencia, fase de crecimiento exponencial y finalmente la fase de estado estacionario en la que prácticamente no hay crecimiento y la cantidad se hace constante. En este estado a estas las células se les puede agregar tripsina y reintroducirlos en medios nuevos a este proceso se le denomina pasaje celular o subcultivo. <sup>(33)</sup>

### -Línea celular

Después del primer pasaje el cultivo primario comienza a ser conocido como línea celular o subclon. Las líneas celulares derivadas de cultivos primarios tienen una vida limitada. <sup>(33)</sup>

## 6. CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

Las células neuroblastomas SH-SY5Y son un subclon de la línea celular neuroblastoma parental SK-N-SH. Esta línea celular parental fue generada en 1970 a partir de una biopsia de médula ósea.<sup>(32)</sup> Las células neuroblastoma SH-SY5Y presentan un cariotipo estable que consta de 47 cromosomas. Esta línea celular se ha usado ampliamente como modelo de neuronas desde principios de la década de 1980, debido a que estas células poseen muchas propiedades bioquímicas y funcionales de las neuronas. Esta línea celular presenta actividad neuronal enzimática (tirosina y dopamina-β-hidroxilasas), captación específica de noradrenalina y expresa uno o más proteínas de neurofilamentos; estas células también expresan receptores opioides, muscarínicos y de factor de crecimiento nervioso.<sup>(32)</sup> Las células neuroblastoma SH-SY5Y poseen la capacidad de proliferar en cultivo durante largos períodos sin contaminación, un prerrequisito para el desarrollo de un modelo celular in vitro. En consecuencia, la línea celular SH-SY5Y se ha utilizado ampliamente en estudios neurológicos experimentales, incluyendo el análisis de diferenciación neuronal, metabolismo, función relacionada con neurodegeneración y procesos neuroadaptativos, neurotoxicidad, y neuroprotección<sup>(33)</sup>

## 7. 4-NITROFENYL 4-(3-FENOXYBENCIL)PIPERAZINA-1-CARBOXILATO

### JZL195

La hidrolasa de amida de ácido graso (FAAH) y la lipasa de monoacilglicerol (MAGL) median la hidrólisis de los endocannabinoides araquidonoil etanolamida (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG), respectivamente. JZL 195 es un potente inhibidor tanto de FAAH como de MAGL inhibe de forma deficiente la neuropatía esterasa, produciendo efectos antinociceptivos, catalepticos y de hipomotilidad es usada como control en investigaciones sobre productos naturales que presenten efectos neuroprotectores.<sup>(34)</sup>  
<sup>(35)</sup>

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación las células de neuroblastoma SH-SY5Y fueron tomadas desde la primera generación las cuales fueron incubadas a 37°C en condiciones de 5% de CO<sub>2</sub>. Cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), 10% de FBS (suero bovino fetal), 50 UI/mL de penicilina, y 50 µg/mL de estreptomina.

#### 1.1.MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 mL
- Matraces Erlenmeyer 50 y 100 mL
- Probeta 100 mL y 1000 mL
- Fiolas de 10, 25 y 50 mL
- Frascos de cultivo celular 10 cm<sup>2</sup> y 25 cm<sup>2</sup> (Sigma-Aldrich)
- Placa de cultivo de 96 pocillos (Falcon)
- Viales
- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorf
- Tubos de centrifuga
- Pipeta automática multicanal 20 µL a 200 µL
- Pipeta de plástico descartable 10 mL, 25 mL (Falcon)
- Pipeteador automatico (Boeco)
- Camara de Flujo Laminar Clase II tipo A2 (Labculture XL200)
- Cámara de incubación (Symphony)

- Centrifuga (DYNAC)
- Microscopio óptico (Olympus)
- Contador electrónico de células (Nexcelom)
- Lector de platos y UV (Telom-R)
- MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]) (Sigma-Aldrich)
- Trypan blue
- Suero bovino fetal
- Dimetilsulfóxido
- PBS (buffer fosfato salino)
- Penicilina
- Peróxido de hidrógeno (Sigma –Aldrich)
- *lepidium meyenii* “maca” Amazon ( Cayman)
- *lepidium meyenii* “maca” Peru ( Cayman)
- 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL 195 (Cayman)
- Línea celular SH-SY5Y (Cayman)

## 2. CULTIVO DE CELULAS DE NEUROBLASTOMA

Se cultivaron células de neuroblastoma SH-SY5Y desde su primera generación, dichas muestras fueron preparadas como se expone a continuación.

Se tomó 1 mL del vial original que contenía células en criogenización y se transfirió a un frasco para cultivo celular al cual se le añadió medio DMEM enriquecido con 10 % FBS y antibiótico hasta un volumen de 5 mL dejando incubar a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. El tiempo de obtención de la primera generación fue entre los 3 y 7 días. Además se verificó la confluencia.

Una vez listas las células se procedió con la separación de las mismas, del frasco de cultivo, desechando el medio con la adición de 3 mL de tripsina, luego se llevó a la incubadora por 15 minutos, agitando suavemente cada 5 minutos. Una vez culminado el tiempo se adicionaron 6 mL de medio dimetilsulfóxido y la suspensión se llevó a centrifugación a 10 000 rpm por 5 minutos en un tubo de centrífuga.

Una vez culminada la centrifugación se eliminó el sobrenadante cuidadosamente asegurándose que quede un pellet de células. Posteriormente se volvió a resuspender en medio DMEM enriquecido con FBS y se homogeniza la suspensión tratando que sea uniforme.

Una vez obtenida la suspensión final es necesario contabilizar la cantidad de células y determinar el porcentaje de viabilidad. Por lo cual, para el conteo de células se transfirieron 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión final a un tubo de microcentrifuga y se añadió 20  $\mu\text{L}$  de trypan blue, se agitó hasta homogeneidad para luego tomar 20  $\mu\text{l}$  y añadir a una placa para conteo celular, las cuales se ingresan al sistema para obtener el porcentaje de viabilidad y el conteo aproximado de células por mililitro.(ver Figuras9 y 10) La suspensión final es la que se utiliza para realizar la siguiente generación o para estudios específicos.



*Figura 9 : Cámara de flujo laminar*



*Figura 10 : Contador automatico de celulas Cellometer auto T4*

### **3. PREPARACION DE ESTANDARES DEL PEROXIDO DE HIDROGENO**

Para provocar daño en las células de estudio; se procedió a la preparación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a partir de una solución stock al 50 % p/p. Para ello se preparó una solución madre al 0.1 M en PBS (Buffer fosfato salino), de esta solución madre se tomó un volumen de 5

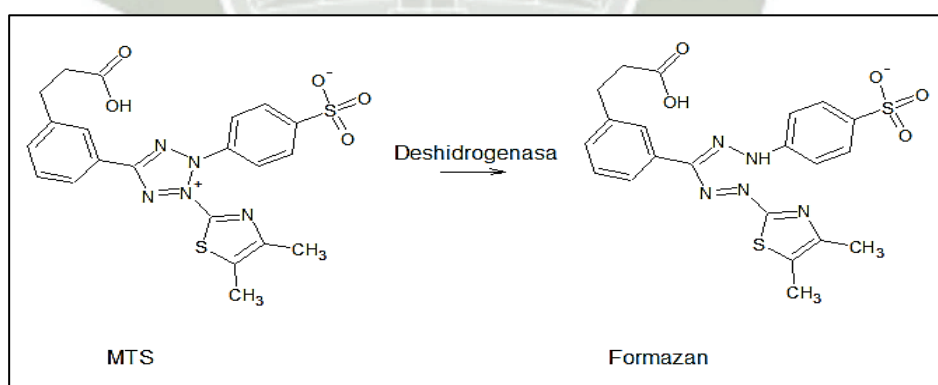
$\mu\text{L}$  y se diluyó en una fiola de 5 mL obteniéndose una concentración de 50 mM. De la solución de 50 mM se tomaron volúmenes de 20  $\mu\text{L}$ , 60  $\mu\text{L}$ , 100  $\mu\text{L}$  y 200  $\mu\text{L}$  en viales, los cuales se diluyeron hasta 1 mL con PBS obteniéndose concentraciones de 1 mM, 3 mM, 5 mM y 10 mM respectivamente.

#### 4. ENSAYO DE MTS

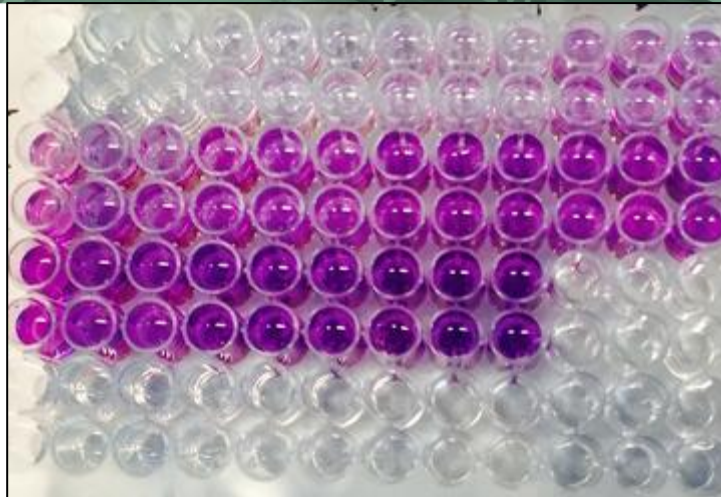
##### 4.1. EFECTO DE PEROXIDO DE HIDROGENO PARA PRODUCCION DE ESTRES OXIDATIVO EN CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

##### -MTS (3-[4, 5, DIMETILTIAZOL-2-IL]-5-[3-CARBOXI- METOXI-FENIL]-2-[4-SULFOFENIL]-2H-TETRAZOLIO)

Se utilizó el ensayo de viabilidad y proliferación celular MTS, derivado de la técnica MTT. Tienen como fundamento, ser un ensayo colorimétrico basado en la reducción de una sal de tetrazolio por una enzima mitocondrial de células metabólicamente activas produciendo un producto formazán que tiene un máximo de absorbancia a 490 nm. Sin embargo la técnica MTS utiliza una sal de tetrazolio diferente a la del MTT llamada (3-[4, 5, dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboxi- metoxi-fenil]-2-[4- sulfofenil]-2H-tetrazolio).<sup>(29,30)</sup> Con este ensayo se intentó demostrar la capacidad la viabilidad de las la línea celular utilizada. Este procedimiento se realizó por triplicado. (Ver Figura 11,12).



**Figura 11.** Reducción de MTS a Formazan por enzimas deshidrogenasa.



**Figura 12.** Ensayo colorimétrico de MTS  
*Fuente: Elaboracion propia*

Para los ensayos de viabilidad se usó de 20000 células/pozo, para ello se programó u filas 5 columnas con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno, un grupo control en platos transparentes:

Control	1 Mm	3 mM	5mM	10 mM
---------	------	------	-----	-------

La primera columna corresponde al blanco contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180  $\mu$ L por pozo de medio con FBS, una vez añadido el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, finalizando la incubación se añade 10  $\mu$ L de PBS y por segunda vez se deja incubando por 6 horas a las mismas condiciones; transcurrido el tiempo se añadió 10  $\mu$ L de MTS y esperamos 3 horas para su lectura.

La segunda columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 1 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180  $\mu$ L por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10 $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 1 mM, y se deja incubando por segunda vez por 6 horas a las mismas condiciones; transcurrido el tiempo se añadió 10  $\mu$ L de MTS .

La tercera columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 3mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180 $\mu$ l por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10  $\mu$ l de

peróxido de hidrógeno al 3 mM, y se deja incubando por segunda vez por 6 horas a las mismas condiciones; transcurrido el tiempo se añadió 10  $\mu$ L de MTS.

La cuarta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 5 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180  $\mu$ l por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno al 5 mM, y se deja incubando por segunda vez por 6 horas a las mismas condiciones; transcurrido el tiempo se añadió 10  $\mu$ L de MTS.

La quinta columna corresponde a la concentración de peróxido de hidrógeno de 10 mM en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180  $\mu$ L por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno al 10 mM, y se deja incubando por segunda vez por 6 horas a las mismas condiciones; transcurrido el tiempo se añadió 10  $\mu$ L de MTS

Al finalizar el tratamiento a todas las muestras en el plato se deja incubando por 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se lleva al lector de platos para la medición de la absorbancia. (Ver Figura 13)



**Figura 13.** Lector de absorbancias Multimodal Synergy HT

A continuación en la Tabla 7 se muestra el procedimiento resumido del ensayo MTS junto a las concentraciones usadas y la cantidad por plato siendo el volumen final de 200  $\mu$ L.

**Tabla 7.** Ensayo MT

	NOMBRE	SH-SY5Y	MEDIO	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	37°C y 5% de CO <sub>2</sub>	MTS	37°C y 5% de CO <sub>2</sub>	LEER (nm)
1	Control	20000c/p	180µL	10 µL	6h	10 µL	3h	490
2	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (1 mM)	20000c/p	180µL	10 µL	6h	10 µL	3h	490
3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3 mM)	20000c/p	180µL	10 µL	6h	10 µL	3h	490
4	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5 mM)	20000c/p	180µL	10 µL	6h	10 µL	3h	490
5	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 mM)	20000c/p	180µL	10 µL	6h	10 µL	3h	490

VOLUMEN FINAL 200 µL

#### 4.2.EFECTO SOBRE LA VIABILIDAD DE CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y PRETRATADAS CON EXTRACTO DE *lepidium meyenii* “maca” SEGUIDO POR PEROXIDO DE HIDROGENO

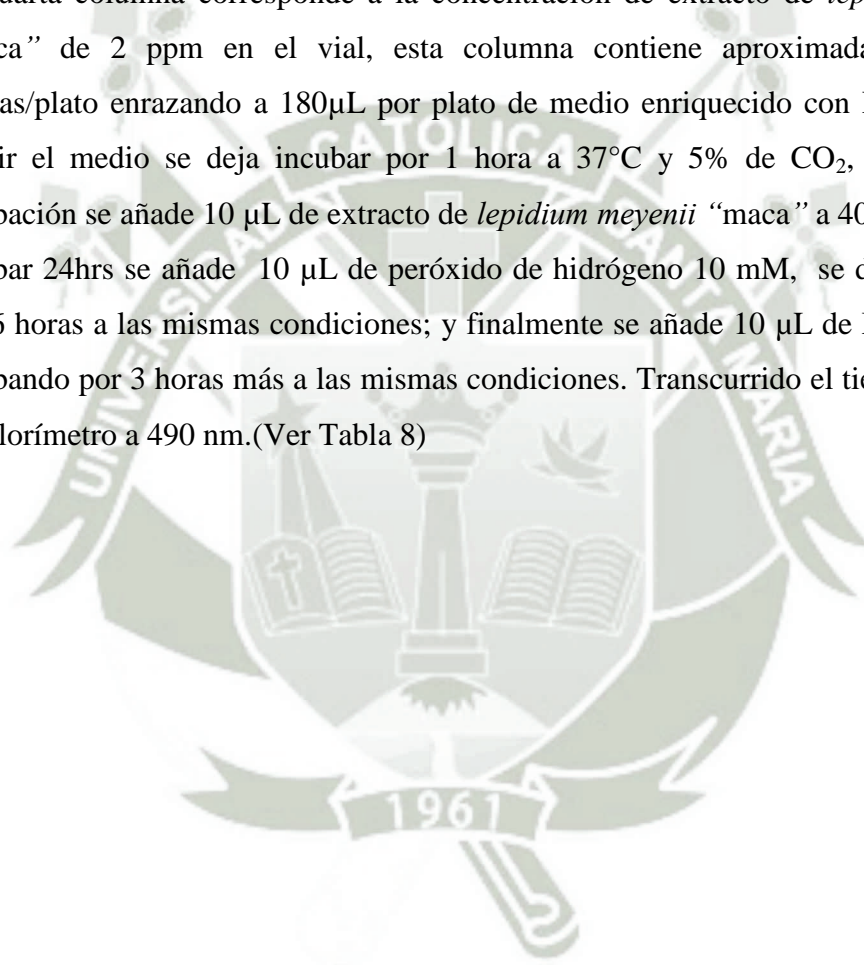
Para los ensayos de viabilidad se obtiene alrededor de 20000 células/plato, esto se desarrolla a partir del número aproximado del conteo celular, se preparó 4 columnas por 4 filas en los platos por cada concentración de *lepidium meyenii* “maca”.

Siendo la primera columna el blanco que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 µL por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% al finalizar la incubación se añade 10 µL de PBS luego de incubar 24hrs se añade 10 µL de peróxido de hidrógeno 10 mM, se deja incubando por 6 horas a las mismas condiciones; y finalmente se añade 10 µL de MTS y se deja incubando por 3 horas más a las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo se lee en el colorímetro a 490 nm.(Ver anexo 4)

La segunda columna corresponde a la concentración de extracto de *lepidium meyenii* “maca” de 0.2 ppm en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180µL por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10 µL de extracto de *lepidium meyenii* “maca” a 4 ppm luego de incubar 24hrs se añade 10 µL de peróxido de hidrógeno 10 mM, se deja incubando por 6 horas a las mismas condiciones; y finalmente se añade 10 µL de MTS y se deja incubando por 3 horas más a las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo se lee en el colorímetro a 490 nm.

La tercera columna corresponde a la concentración de extracto de *lepidium meyenii* “maca” de 1 ppm en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180 $\mu$ L por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10  $\mu$ L de extracto de *lepidium meyenii* “maca” a 20  $\mu$ M luego de incubar 24hrs se añade 10  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno 10 mM, se deja incubando por 6 horas a las mismas condiciones; y finalmente se añade 10  $\mu$ L de MTS y se deja incubando por 3 horas más a las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo se lee en el colorímetro a 490 nm.

La cuarta columna corresponde a la concentración de extracto de *lepidium meyenii* “maca” de 2 ppm en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180 $\mu$ L por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10  $\mu$ L de extracto de *lepidium meyenii* “maca” a 40 ppm luego de incubar 24hrs se añade 10  $\mu$ L de peróxido de hidrógeno 10 mM, se deja incubando por 6 horas a las mismas condiciones; y finalmente se añade 10  $\mu$ L de MTS y se deja incubando por 3 horas más a las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo se lee en el colorímetro a 490 nm.(Ver Tabla 8)



**Tabla 8.** Ensayo de viabilidad en muestras pre tratadas con *lepidium meyenii* “maca”.

N	NOMBRE	SH-SY5Y	MEDIO (ml)	37°C y 5% de CO <sub>2</sub>	lepidium meyenii “maca”	37°C y 5% de CO <sub>2</sub>	H2O <sub>2</sub> (μL)	37°C y 5% de CO <sub>2</sub>	MTS (μL)	37°C y 5% de CO <sub>2</sub>	LEER (nm)
1	Blanco	20000c/p	180	1h	--	24h	10	6h	10	3h	490
2	MACA (0.2 ppm)	20000c/p	180	1h	10 μL	24h	10	6h	10	3h	490
3	MACA (1 ppm)	20000c/p	180	1h	10 μL	24h	10	6h	10	3h	490
4	MACA (2ppm)	20000c/p	180	1h	10 μL	24h	10	6h	10	3h	490

### 4.3. EFECTO NEUROPROTECTOR SOBRE CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y PRETRATADAS CON 4-NITROFENYL 4-(3-FENOXYBENCIL)PIPERAZINA-1-CARBOXILATO JZL195

Para los ensayos de viabilidad se usó de 20000 células/pozo, esto se desarrolla a partir del número aproximado del conteo celular. Además se prepara a partir de una solución madre 1 mM de 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 soluciones de 4, 20 y 40 ppm para los ensayos mostrados a continuación.

Se preparó 4 columnas por 4 filas y contrastado un blanco en los platos:

Siendo la primera columna el blanco que contiene aproximadamente 20000 células/pozo enrazando a 180 μL por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% al finalizar la incubación se añade 10 μL de PBS luego de incubar 24hrs se añade 10 μL de peróxido de hidrógeno 10 mM, se deja incubando por 6 horas a las mismas condiciones; y finalmente se añade 10 μL de MTS y se deja incubando por 3 horas más a las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo se lee en el colorímetro a 490 nm.

La segunda columna corresponde a el inhibidor 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 de 0.2 ppm en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180 μL por plato de

medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10 µL de 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 a 4 ppm luego de incubar 24hrs se añade 10 µL de peróxido de hidrógeno 10 mM, se deja incubando por 6 horas a las mismas condiciones; y finalmente se añade 10 µL de MTS y se deja incubando por 3 horas más a las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo se lee en el colorímetro a 490 nm.

La tercera columna corresponde a el inhibidor 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 de 1 ppm en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180µL por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10 µL de 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 a 20 ppm luego de incubar 24hrs se añade 10 µL de peróxido de hidrógeno 10 mM, se deja incubando por 6 horas a las mismas condiciones; y finalmente se añade 10 µL de MTS y se deja incubando por 3 horas más a las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo se lee en el colorímetro a 490 nm.

La cuarta columna corresponde a el inhibidor 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 de 2 ppm en el vial, esta columna contiene aproximadamente 20000 células/plato enrazando a 180µL por plato de medio enriquecido con FBS, luego de añadir el medio se deja incubar por 1 hora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, al finalizar la incubación se añade 10 µL de J4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 a 40 ppm luego de incubar 24hrs se añade 10 µL de peróxido de hidrógeno 10 mM, se deja incubando por 6 horas a las mismas condiciones; y finalmente se añade 10 µL de MTS y se deja incubando por 3 horas más a las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo se lee en el colorímetro a 490 nm.(Ver Tabla 9)

**Tabla 9.** Ensayo con 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195

N	NOMBRE	SH-SY5Y	MEDIO (ml)	37°C y 5% de CO2	JZL	37°C y 5% de CO2	H2O2 (µL)	37°C y 5% de CO2	MTS (µL)	37°C y 5% de CO2	LEER (nm)
1	Blanco	20000c/p	180	1h	0 µL	24h	10	6h	10	3h	490
2	JZL (0.2 ppm)	20000c/p	180	1h	10 µL	24h	10	6h	10	3h	490
3	JZL (1 ppm)	20000c/p	180	1h	10 µL	24h	10	6h	10	3h	490
4	JZL (2ppm)	20000c/p	180	1h	10 µL	24h	10	6h	10	3h	490

#### 4.3. ANALISIS ESTADISTICO

Para el análisis de cada muestra se utilizó el análisis de varianza ANOVA seguido por el test de Tukey.

A) Análisis de varianza ANOVA Cuando se pretende comprobar si hay diferencia entre dos o más grupos, el análisis de varianza ANOVA es el indicado ya que indica si hay o no diferencia significativa entre dos o varios grupos.

B) Test Tukey

Una vez obtenidos los cálculos se determinan los siguientes parámetros estadísticos:

**-Parámetro de distribución central:**

**Promedio:** Valor que representa un conjunto de datos. Señala un centro de los valores.

$$\bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

**Dónde:**  $\sum x$ : Sumatoria del conjunto de datos.

n: Número de datos.

**Parámetro de dispersión:**

**Desviación Estándar (S):** Se considera como la raíz cuadrada de la varianza.

$$S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{n-1}}$$

**Dónde:**  $\sum x$ : Sumatoria del conjunto de datos.

n: Número de datos.

**-Pruebas de Significación:****-Análisis de Varianza**

Si tres o más muestras van a compararse, para ver si están tomadas de la misma población, el análisis de varianza (una especie de prueba t múltiple) puede usarse como medio de comparación.

Existen dos únicas fuentes de variación, entre grupos y dentro de los grupos, como se indica en la tabla de análisis de varianza. Los cuadrados de las medias se obtienen dividiendo las sumas de los cuadrados por sus correspondientes grados de libertad. La fórmula para calcular la relación F es:

$$F = \frac{\text{Cuadrado de las medias entre grupos}}{\text{Cuadrado de las medias dentro de los grupos}}$$

Para probar la significación en la relación F se recurre a tablas. Se analiza si el valor calculado para F es menor o mayor que el que se indica en tablas de acuerdo a los grados de libertad. En el primer caso, se concluirá que todos los grupos son iguales, en caso contrario se concluirá que no todos los grupos son iguales, entre algunos o todos existe una diferencia estadística significativa.

**-Prueba de Especificidad: DSF de Tukey**

Esta prueba de especificidad, también diferencia significativa franca de Tukey, se aplica una vez obtenidos los resultados del análisis ANOVA, es decir, si al análisis de varianza los resultados obtenidos fueran significativos a los diferentes tratamientos, se procederá a averiguar estadísticamente cual de ellos fue más eficiente o más específico, de no hallarse significancia a la prueba del ANOVA no será necesario realizar ninguna prueba de

especificidad. Esta prueba se calcula con un  $p = 0.05$  y se aplica a cualquier número de tratamientos, se usa la siguiente fórmula:

$$DSF = q_{(K,M)} \sqrt{\frac{MC_{(en)}}{n}}$$

**Dónde:**

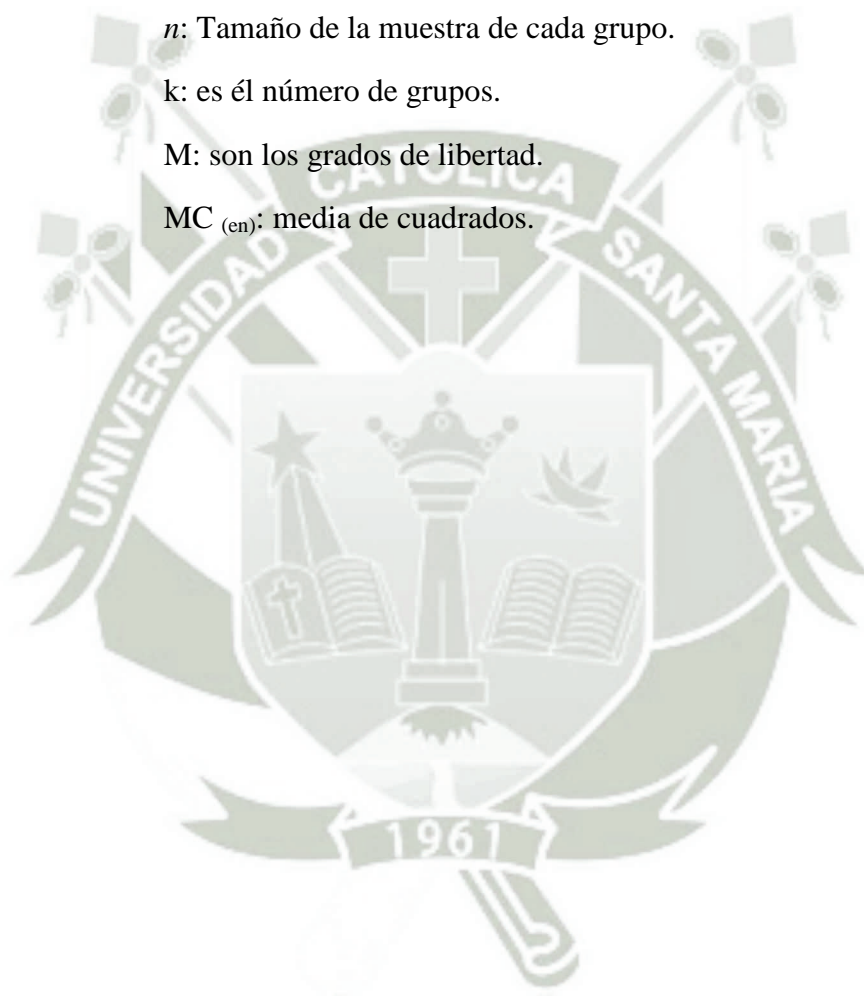
$q$ : valor tabulado en tablas para  $p = 0.05$ .

$n$ : Tamaño de la muestra de cada grupo.

$k$ : es el número de grupos.

$M$ : son los grados de libertad.

$MC_{(en)}$ : media de cuadrados.



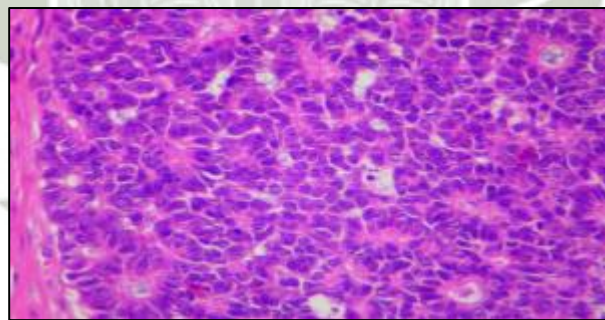
## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

Para el desarrollo de presente proyecto, las células de neuroblastoma SH-SY5Y fueron proporcionadas por la Universidad MCPHS así como también el ambiente y los equipos.

#### 1. CULTIVO DE CELULAS NEUROBLASTOMA

En la Figura 14 se observa las células de neuroblastoma que fueron cultivadas a partir de células en criogenización tomando 1 mL de la misma en una frasco para cultivo celular con medio DMEM enriquecido con 10 % FBS así como se menciona en el capítulo anterior dejando incubar a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. El tiempo de obtención de la primera generación fue entre los 3 y 7 días. También se observa que la confluencia de las células es por encima del 95 %, esto se debe a la mínima presencia de espacios sin células adheridas.



**Figura 14.** Células de neuroblastoma SH-SY5Y

Una vez evaluada la confluencia se procedió a separar las células del frasco de cultivo con la adición de tripsina.

La cual fue inactivada con el medio DMEM y llevada a centrifugación para la obtención de pellet celular. (Ver Figura 15)



**Figura 15.** Pellet de células

Se resuspendió en medio DMEM con FBS homogenizando para contabilizarla usando la técnica de azul de Tripan. Se trabajó con 7 generaciones durante todo el experimento; a las cuales se les hizo conteo celular dichos resultados se observan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Conteo celular y porcentaje de viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y

<b>CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y</b>		
<b>Generación</b>	<b>Células/ml</b>	<b>% Viabilidad</b>
<b>1</b>	1890000	96.4
<b>2</b>	1770000	99.4
<b>3</b>	2060000	95.9
<b>4</b>	2020000	94.3
<b>5</b>	1950000	97.0
<b>6</b>	2400000	96.9
<b>7</b>	2080000	86.9
<b>PROMEDIO</b>	2024285.71	95.25
<b>DS</b>	197387.702	3.98

La suspensión final obtenida fue utilizada para realizar estudios específicos del presente proyecto. Se cultivaron siete generaciones de células de neuroblastomas SH-S5SY con el objetivo de comprobar la viabilidad constante que existe en las siete generaciones cultivadas.

## **2. EFECTO SOBRE EL DAÑO DE LAS CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y PRODUCIDO POR PEROXIDO DE HIDROGENO**

Una vez realizado los estudios de viabilidad de las células de neuroblastoma se procedió al estudio del efecto que causa el peróxido de hidrógeno con el objetivo de simular la oxidación que se produce en las células en la enfermedad de Alzheimer sobre la viabilidad

de las células cuyos resultados se muestran a continuación en la Tabla 11. Dichos ensayos fueron realizados a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 11.** Porcentaje de viabilidad afectada por diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0 mM	10 mM	5 mM	3 mM	1 mM
<b>Viabilidad (%)</b>	100.0	45.8	52.9	72.4	85.5
	99.2	43.2	51.3	71.9	83.7
	98.8	42.1	50.7	71.0	84.6
	96.9	41.0	49.9	68.6	82.5
	95.5	40.2	50.3	65.7	80.8
<b>Promedio</b>	98.1	42.5	51.0	69.9	83.4
<b>SD</b>	1.9	2.2	1.2	2.8	1.8

En esta tabla podemos observar el efecto de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la viabilidad celular donde a mayor concentración hay un aumento de muerte celular frente a estos resultados se decidió trabajar con la 10 mM de peróxido de hidrógeno. Ya que el objetivo de este trabajo es encontrar una alternativa de tratamiento de Alzheimer para la fase severa y además tomamos como referencia otras investigaciones para usar dichas concentraciones de peróxido de hidrógeno. Para evaluar el efecto del peróxido de hidrógeno se procedió a realizar un análisis de varianza ANOVA el cual se detalla en la Tabla 12. La probabilidad resultó menor a 0.05 lo cual indica que al menos un grupo es diferente, este resultado puede confirmarse al comparar el F crítico que fue de 2.87, dicho valor es mucho menor al valor del F experimental siendo su valor de 627.10 comprobándose que los grupos no son iguales al 95 % de confianza.

**Tabla 12.** Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Entre grupos</b>	10406.67	4	2601.67	627.10	1.05E-20	2.87
<b>Dentro de los grupos</b>	82.97404	20	4.15			
<b>Total</b>	10489.65	24				

Para evaluar si el efecto de alguna de las concentraciones de peróxido de hidrógeno no produce suficiente daño en la viabilidad de las células se utilizó el test de Dunnet que compara el grupo control versus los resultados de cada concentración de peróxido. Los resultados de muestran en la Tabla 13 donde nos indica que los efectos producidos en la viabilidad de la células de cada uno de los ensayos con peróxido de hidrógeno son diferentes al grupo control.

Concluyéndose que el peróxido de hidrógeno a cada una de las concentraciones estudiadas produce una disminución en el porcentaje de viabilidad.

**Tabla 13.** Test de Dunnet

Nivel	N	Promedio	Grupo
<b>0 uM (control)</b>	5	98.064	A
<b>1 uM</b>	5	83.400	B
<b>3 uM</b>	5	69.908	C
<b>5 uM</b>	5	51.004	D
<b>10 uM</b>	5	42.456	E

Por otro lado se busca establecer si existe alguna similitud entre alguno de los grupos o si difieren todos. Para ello se utilizó el test de Tukey (Ver Tabla 14) que nos indica que todos los grupos difieren entre sí.

**Tabla 14.** Test de Tukey

Nivel	N	VALOR	GRUPO
<b>0 uM</b>	5	98.064	A
<b>1 uM</b>	5	83.400	B
<b>3 uM</b>	5	69.908	C
<b>5 uM</b>	5	51.004	D
<b>10 uM</b>	5	42.456	E

En la Figura 16 se puede observar el diagrama de cajas y bigotes correspondiente al ensayo del efecto sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma SH-SY5Y con peróxido de hidrógeno, en dicha figura se puede observar que a medida que se incrementa la concentración de peróxido de hidrógeno el porcentaje de viabilidad disminuye.

Con los resultados obtenidos se puede decir que el peróxido de hidrógeno es adecuado para la producción de daño celular y seguir con los objetivos del presente proyecto.

Venuprasad<sup>36</sup> en su investigación encontró que el peróxido de hidrógeno causa estrés oxidativo dependiente de la concentración en células neuroblastoma SH-SY5Y simulando el proceso que se desarrolla en el mecanismo de la enfermedad Alzheimer confirmando mis resultados obtenidos a concentraciones de 2 mM, 5 mM, 10 mM.

Al igual que otras investigaciones usaron peróxido de hidrógeno para producir estrés oxidativo ya que una de las principales causas del origen del Alzheimer.

Por otro lado se debe saber que dependiendo de la concentración es probable evaluar la viabilidad lo que permite realizar estudios con *lepidium meyenii* “maca”<sup>(37)</sup>

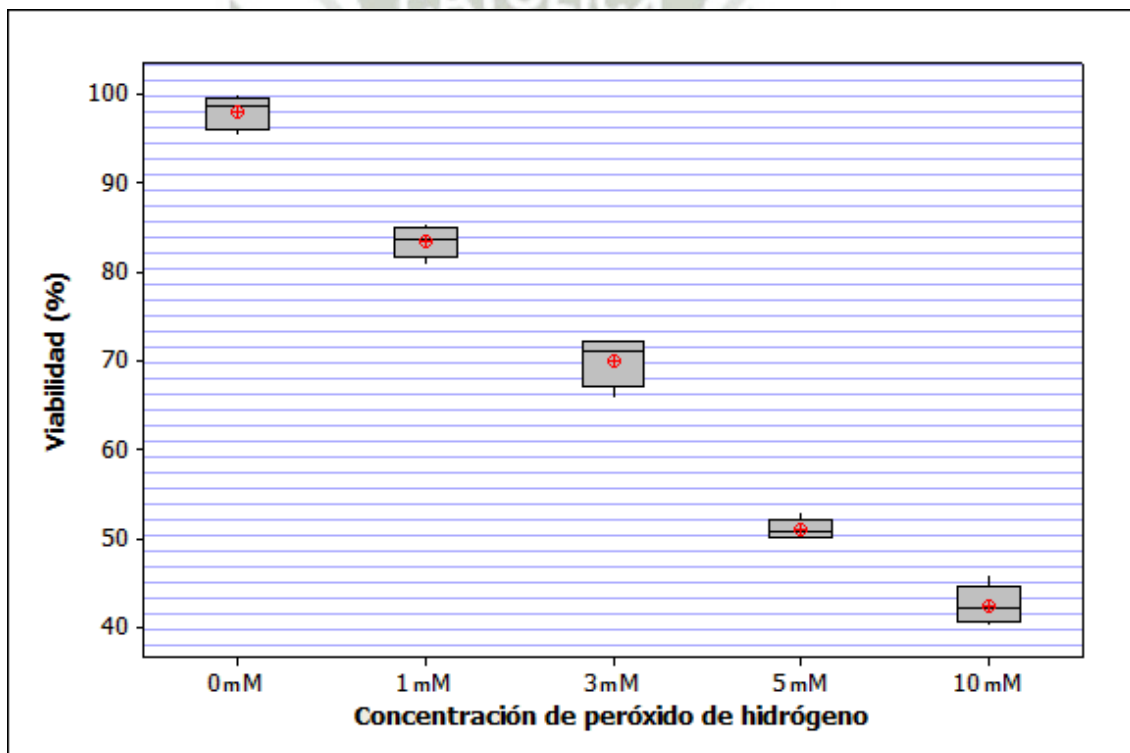


Figura 16. Diagrama de Cajas y bigotes para el ensayo de peróxido de hidrógeno.

### 3. EVALUACION DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y PRETRATADAS CON EXTRACTO DE *lepidium meyenii* “maca” SEGUIDO POR PEROXIDO DE HIDROGENO

Dado que no hay ningún tratamiento actual que ha sido eficaz para detener o retardar la muerte celular no existía mucha investigación dedicada a los productos naturales, tales

como extractos de plantas y compuestos aislados, que podrían actuar como agentes neuroprotectores para enfermedades neurodegenerativas. <sup>(38)</sup>

Recientemente, se ha sugerido que el extracto de *lepidium meyenii* “maca” y sus constituyentes macamidas tiene efectos neuroprotectores. <sup>(39)</sup>

Por lo expuesto los efectos se evaluaron previamente in vitro a diferentes concentraciones y se trabajó con dos extractos de diferentes procedencias, Uno de ellos obtenidos en el Peru y otro proporcionado por Amazon, cabe resaltar que los extractos ya habían sido preparados anteriormente en el lugar de estudio. <sup>(39)</sup>

Para evaluar el efecto sobre el porcentaje de viabilidad de células de neuroblastoma SH-SY5Y se pre trataron las células con dos variedades de *lepidium meyenii* “maca”. <sup>(39)</sup>

En la Tabla 15 se puede observar los resultados de los ensayos con *lepidium meyenii* “maca” Perú, así mismo en la Tabla 18 con *lepidium meyenii* “maca” Amazon. En dichos ensayos se utilizaron concentraciones de 0.2 ppm, 1 ppm, 2 ppm de cada especie vegetal y 10 mM de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, estos ensayos se contrastaron con 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 para ver la efectividad de ambos tipos de *lepidium meyenii* “maca”. Los resultados con 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 se pueden observar en la Tabla 21.

### 3.1. *lepidium meyenii* “maca” PERU (Ver anexo 3)

**Tabla 15.** Ensayo de viabilidad con *lepidium meyenii* “maca” Perú

Ensayo	Blanco	0.2 ppm	1 ppm	2 ppm
	98.0	33.7	37.9	80.8
<b>Viabilidad (%)</b>	103.4	24.0	41.5	77.5
	98.6	27.0	44.6	74.8
<b>MEAN</b>	100.0	28.2	41.3	77.7
<b>SD</b>	3.0	5.0	3.3	3.0
<b>SEM</b>	1.33	2.21	1.49	1.35

Por otro lado se realizó un análisis de varianza donde los resultados se muestran en la Tabla 16, en la cual se puede observar que la probabilidad es mucho menor que 0.05 lo que indica que al menos un grupo es diferente.

**Tabla 16.** Análisis de varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9776.89	3	3258.96	242.81	3.41E-08	4.06
Dentro de los grupos	107.37	8	13.42			
<b>Total</b>	<b>9884.26</b>	<b>11</b>				

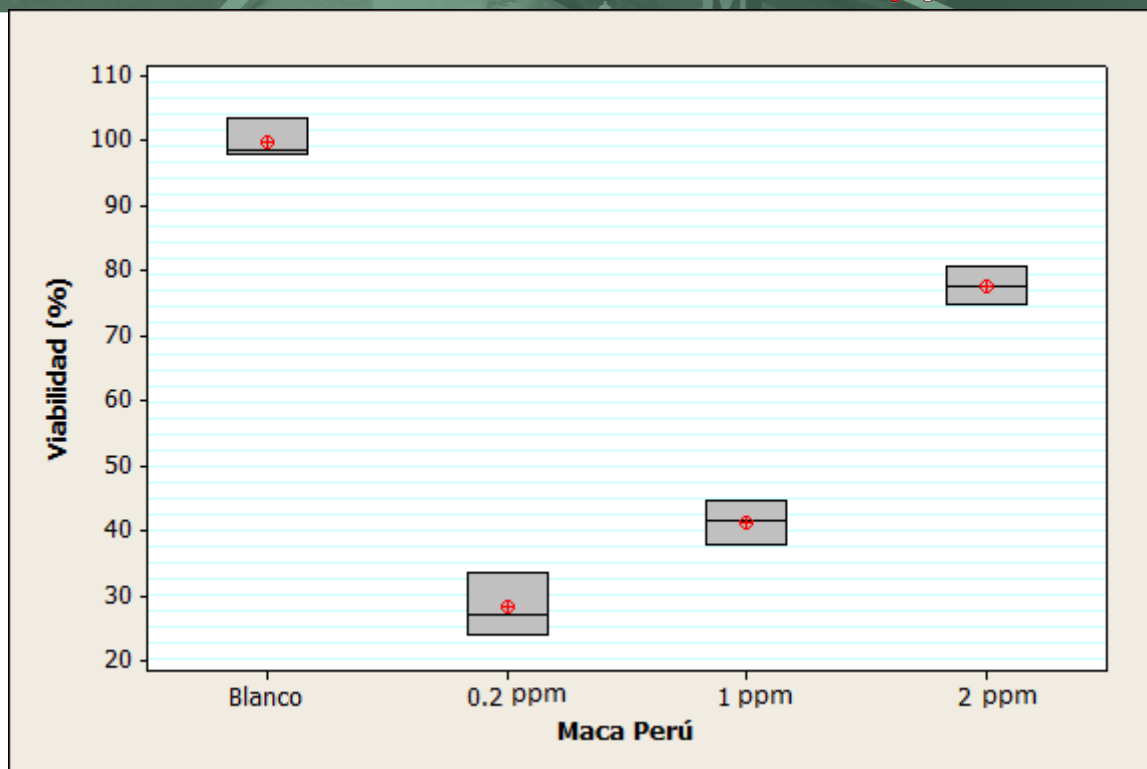
Finalmente se realizó el test de tukey que nos indica que todos los grupos son diferentes dichos resultados se pueden comprobar observando la Tabla 17.

Se puede observar que a mayor concentración de la especie vegetal existe mayor efecto neuroprotector.

**Tabla 17.** Test de Tukey

	N	VALOR	GRUPO
<b>Blanco</b>	3	100.000	A
<b>2 uM</b>	3	77.722	B
<b>1 uM</b>	3	41.331	C
<b>0.2 uM</b>	3	28.226	D

En la Figura 17 se puede observar que ninguno de los tratamientos se asemeja a los valores del blanco lo que indica que la *lepidium meyenii* “maca” Perú a las concentraciones trabajadas no logra aproximarse al 100 % de viabilidad, sin embargo a medida que se incrementa la concentración de *lepidium meyenii* “maca” (de 0.1 ppm a 2 ppm) el porcentaje de viabilidad tiende a aumentar comprobándose que la *lepidium meyenii* “maca” Perú si tiene un efecto contrario al producido por el peróxido de hidrógeno.



**Figura 17.** Diagrama de cajas y bigotes para el ensayo con *lepidium meyenii* “maca” Perú

### 3.2. *lepidium meyenii* “maca” AMAZON (VER ANEXO 3)

**Tabla 18.** Ensayo de viabilidad con *lepidium meyenii* “maca” Amazon

Ensayo	Blanco	0.2 ppm	1 ppm	2 ppm
	92.1	17.0	39.6	69.5
<b>Viabilidad (%)</b>	103.2	18.8	37.0	75.4
	104.7	33.7	42.8	65.1
<b>MEAN</b>	100.0	23.2	39.8	70.0
<b>SD</b>	6.9	9.2	2.9	5.1
<b>SEM</b>	3.08	4.11	1.31	2.30

Se realizó un análisis de varianza donde los resultados se muestran en la Tabla 19, en la cual se puede observar que la probabilidad es mucho menor que 0.05 lo que indica que al menos un grupo es diferente.

**Tabla 19.** Análisis de Varianza

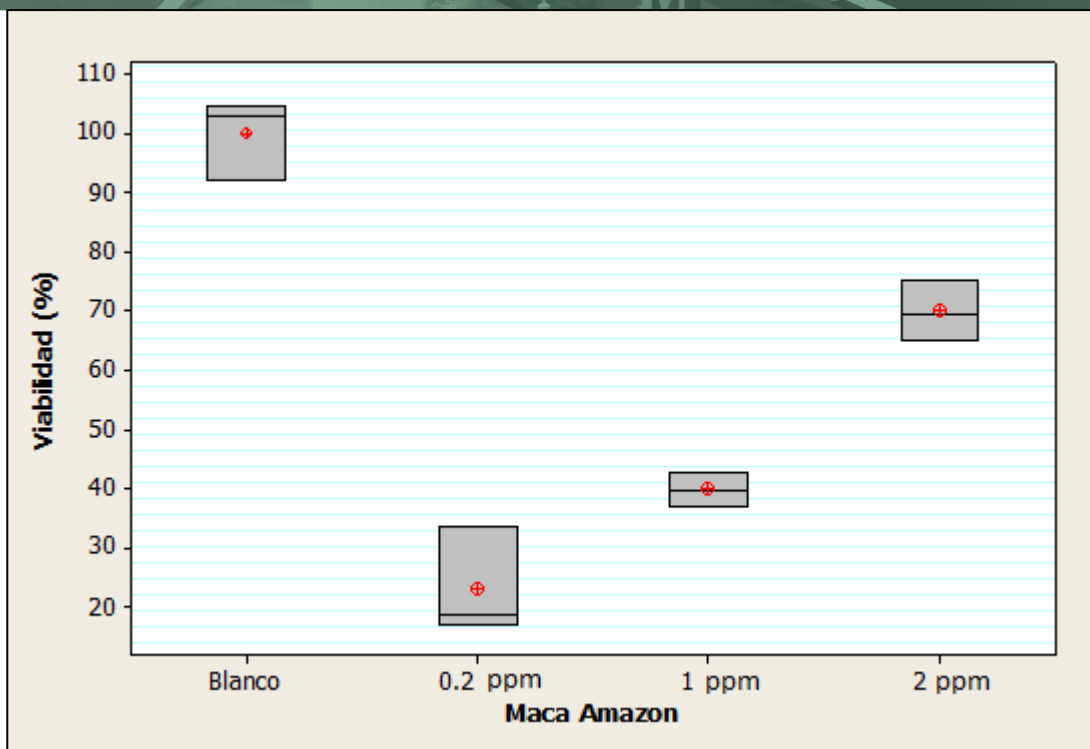
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	10357.98	3	3452.66	82.66	2.32E-06	4.066
Dentro de los grupos	334.13	8	41.77			
<b>Total</b>	<b>10692.11</b>	<b>11</b>				

Una vez realizado el análisis de varianza se procede a realizar el test de Tukey que nos indica que ninguno de los tratamientos logra aproximarse a los valores del blanco sin embargo no existe diferencia entre los porcentajes de viabilidad obtenidos usando las concentraciones de 0.2 ppm y 1.0ppm. (Ver tabla 20)

**Tabla 20.** Test de Tukey

	N	VALOR	GRUPO
<b>Blanco</b>	3	100.00	A
<b>2 uM</b>	3	69.99	B
<b>1 uM</b>	3	39.78	C
<b>0.2 uM</b>	3	23.17	C

A continuación, en la Figura 18 se puede observar que a medida que se aumenta la concentración de lepidium meyenii “maca” Amazon el porcentaje de viabilidad tiende a aumentar aproximándose a los valores del blanco (100 % de viabilidad)



**Figura 18.** Diagrama de cajas y bigotes correspondiente a *lepidium meyenii* “maca” amazon.

### 3.3. ENSAYO CON 4-NITROFENYL 4-(3-FENOXYBENCIL)PIPERAZINA-1-CARBOXILATO JZL195 (VER ANEXO 3)

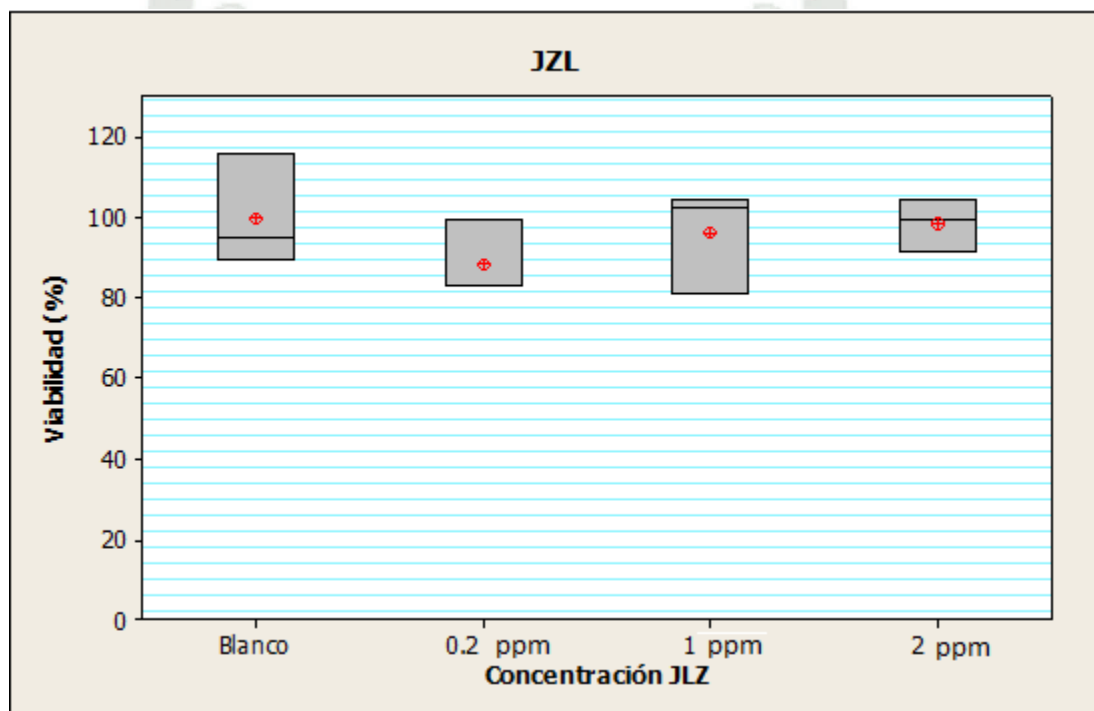
**Tabla 21.** Ensayo de viabilidad con 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195

Ensayo	Blanco	0.2 ppm	1 ppm	2ppm
	101.70	89.30	93.52	98.70
Viabilidad (%)	98.60	87.57	97.72	97.37
	99.70	88.00	96.56	99.15
MEAN	100.00	88.29	95.93	98.41
SD	1.57	0.90	2.17	0.93
SEM	6.34	4.19	5.82	2.87

Con los resultados obtenidos en la Tabla 21 se procedió a desarrollar un análisis de varianza ANOVA (ver Tabla 22), donde se puede observar que la probabilidad es mayor a 0.05 lo que indica que no existe diferencia entre grupos al 95 % de confianza lo que indica que el JZL logra aproximarse a los valores del blanco (100 % de viabilidad), esto se confirma al observar la Figura 19.

**Tabla 22.** Análisis de Varianza

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	242.25	3	80.75	0.65	0.61	4.067
Dentro de los grupos	998.75	8	124.84			
<b>Total</b>	<b>1240.99</b>	<b>11</b>				



**Figura 19.** Diagrama de cajas y bigotes correspondiente al ensayo 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil) piperazina-1-carboxilato JZL195

Ali<sup>1</sup> obtuvo resultados similares a los obtenidos en la presente investigación demostrando que las células neuroblastoma SH-SY5Y después de inducirles estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno y tratarlas con *lepidium meyenii* “maca” de Perú a una concentración de 2ppm aumenta significativamente la viabilidad celular, lo que indica la que la *lepidium meyenii* “maca” “*Lepidium Meyenii*” tiene efecto neuroprotector dependiente de la concentración.

Pino<sup>3</sup> en la investigación que realizó uso diferentes concentraciones de *lepidium meyenii* “maca” 2, 4, 6, 8,10 ppm siendo las concentraciones efectivas 8 y 10 ppm.

#### 4. ESTUDIO COMPARATIVO DE *lepidium meyenii* “maca” PERU CON 4-

##### NITROFENYL 4-(3-FENOXYBENCIL) PIPERAZINA-1-CARBOXILATO JZL195

Para comparar los porcentajes de viabilidad obtenidos en los ensayos con *lepidium meyenii* “maca” Perú y 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil) piperazina-1-carboxilato JZL195 se procedió a realizar un análisis de varianza de dos vías.

Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 23 donde la probabilidad de la interacción de ambos proporciona una probabilidad menor a 0.05 que indica que los porcentajes obtenidos con *lepidium meyenii* “maca” Perú se próxima pero no se igualan a la efectividad presentada por 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil) piperazina-1-carboxilato JZL195.

**Tabla 23.** ANOVA de dos vías de *lepidium meyenii* “maca” Perú versus 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
<b>Muestra</b>	9161.25	1	9161.3	160.2	2.67E-08	4.75
<b>Columnas</b>	2747.61	2	1373.8	24.0	6.38E-05	3.89
<b>Interacción</b>	1365.19	2	682.6	11.9	0.001403	3.89
<b>Dentro del grupo</b>	686.40	12	57.2			
<b>Total</b>	13960.46	17				

Es importante contrastar los resultados con *lepidium meyenii* “maca” con ensayos ya estandarizados 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 para definir el grado de beneficio que presenta esta especie frente a daño celular, ya que el ensayo de 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 está validado internacionalmente siendo un marcador importante en ensayos de viabilidad.

#### 5. ESTUDIO COMPARATIVO DE *lepidium meyenii* “maca” AMAZON CON 4-

##### NITROFENYL 4-(3-FENOXYBENCIL)PIPERAZINA-1-CARBOXILATO JZL195

Para comparar los porcentajes de viabilidad obtenidos en los ensayos con *lepidium meyenii* “maca” Amazon y 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 se procedió a realizar un análisis de varianza de dos vías.

Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 24 donde la probabilidad de la interacción de ambos proporciona una probabilidad menor a 0.05 que indica que los porcentajes obtenidos con *lepidium meyenii* “maca” Amazon se próxima pero no se igualan a la efectividad presentada por 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195.

**Tabla 24.** ANOVA de dos vías de *lepidium meyenii* “maca” Amazon versus 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil) piperazina-1-carboxilato JZL195

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	11204.53	1	11204.53	160.86	2.6E-08	4.75
Columnas	2449.56	2	1224.78	17.58	0.000271	3.89
Interacción	1098.24	2	549.12	7.88	0.006515	3.89
Dentro del grupo	835.85	12	69.65			
Total	15588.19	17				

## 6. ESTUDIO COMPARATIVO DE *lepidium meyenii* “maca” AMAZON CON *lepidium meyenii* “maca” PERU

Para comparar los porcentajes de viabilidad obtenidos en los ensayos con *lepidium meyenii* “maca” Amazon y *lepidium meyenii* “maca” Perú se procedió a realizar un análisis de varianza de dos vías.

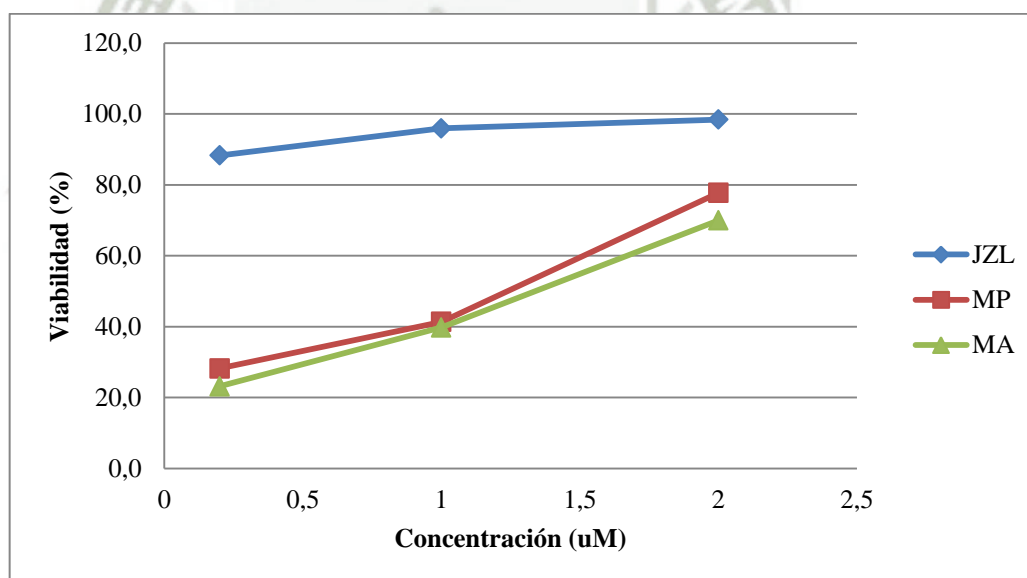
Los resultados obtenidos se pueden observar en la Tabla 25 donde la probabilidad de la interacción de ambos proporciona un valor mayor a 0.05 que indica que los porcentajes obtenidos con *lepidium meyenii* “maca” Amazon y *lepidium meyenii* “maca” Perú son similares al 95 % de confianza.

**Tabla 25.** ANOVA de dos vías de *lepidium meyenii* “maca” Amazon versus *lepidium meyenii* “maca” Perú

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F

<b>Muestra</b>	102.76	1	102.76	3.75	0.076615	4.75
<b>Columnas</b>	7297.94	2	3648.97	133.26	6.4E-09	3.89
<b>Interacción</b>	28.87	2	14.44	0.53	0.603285	3.89
<b>Dentro del grupo</b>	328.59	12	27.38			
<b>Total</b>	7758.16	17				

En la Figura 20 se puede observar que tanto la *lepidium meyenii* “maca” Perú como *lepidium meyenii* “maca” Amazon tienden a aproximarse a los valores obtenidos por 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil) piperazina-1-carboxilato JZL195 concluyendo que ambas *lepidium meyenii* “maca”s poseen similar actividad y dicha actividad se aproxima a 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil)piperazina-1-carboxilato JZL195 a medida que se incrementa la concentración de cada *lepidium meyenii* “maca”.



**Figura 20.** Efecto sobre la viabilidad de *lepidium meyenii* “maca” Perú (MP), Amazon (MA) y 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil) piperazina-1-carboxilato JZL195.

Podemos concluir diciendo que al aproximarse los valores a valores de 4-nitrofenyl 4-(3-fenoxybencil) piperazina-1-carboxilato JZL195 a la *lepidium meyenii* “maca” presenta efecto neuroprotector ya que alcanza un porcentaje muy cercano a el inhibidor JZL 195.<sup>(34),(35),(39)</sup>

## CONCLUSIONES

1. El peróxido de hidrógeno afecta la viabilidad tanto de las células de neuroblastoma SH-SY5Y, el daño es significativo a una concentración de 10 mM disminuyendo el porcentaje de viabilidad hasta un 42.5 %.
2. Los resultados demuestran que el extracto de *lepidium meyenii* “maca” Perú tiene efecto neuroprotector al incrementar la viabilidad de las células SH-SY5Y hasta un 77.7 % a una concentración de 2 ppm al ser tratadas con peróxido de hidrógeno (agente inductor de daño celular). Los resultados demuestran que el extracto de *lepidium meyenii* “maca” Amazon tiene efecto neuroprotector al incrementar la viabilidad de las células SH-SY5Y hasta un 70 % a una concentración de 2 ppm al ser tratadas con peróxido de hidrógeno.
3. El ensayo con JZL incrementa la viabilidad de las células SH-SY5Y hasta un 98.4 % a una concentración de 2 ppm al ser tratadas con peróxido de hidrógeno. El estudio comparativo de *lepidium meyenii* “maca” Perú y *lepidium meyenii* “maca” Amazon con JZL demostró que ambas especies de *lepidium meyenii* “maca” no incrementan el porcentaje de viabilidad hasta niveles similares a JZL a un 95 % de confianza.
4. El estudio comparativo de *lepidium meyenii* “maca” Perú y *lepidium meyenii* “maca” Amazon demostró que no existe diferencia significativa entre ambas especies *lepidium meyenii* “maca”s a un 95 % de confianza.

## SUGERENCIAS

1. Se desea incentivar la investigación sobre la *lepidium meyenii* “maca” para la mejora continua en los aspectos de investigación y desarrollo de nuevas formas farmacéuticas, ya que ha mostrado ser un producto natural con una amplia gama efectos terapéuticos como lo demuestran en los diversos trabajos de investigación además es una alternativa terapéutica.
2. Se recomienda realizar pruebas específicas en organismos para la detección *lepidium meyenii* “maca” y su interacción con receptores a nivel neuronal teniendo como ejemplo la prueba por Western Blot.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Maritim A.C, Sanders R., Watkins J. Oxidative stress and oxidants: a review. J biochem mol toxicol, 2013-TESIS
2. Hansen H., Ikonomidou, P. Bittigau, S. Hansen. accumulation of the anandamide precursor and other n-acylethanolamine phospholipids in infant rat models of in vivo necrotic and apoptotic neuronal death. J. Neurochem. 76, 39, (2001)-TESIS
3. Selkoe D., alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological reviews 2001
4. Avramopoulos dgenetics of alzheimer's disease: recent advances. Genome medicine 2009,review.
5. Gonzales, G. “Ethnobiology and ethnopharmacology of lepidium meyenii (lepidium meyenii “maca”), a plant from the peruvian highlands”. Evidence-based complementary and alternative medicine, pp. 1-10, 2012
6. Pino-figueroa, A.; Bohlke, M.; d. Maher, T. lepidium meyenii “maca”: a review on its phytochemical and pharmacological profile” mechanism and action of phytoconstituents, , pp, 9-27,2011
7. Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P; Schettino, o. “Chemical composition of lepidium meyenii” food chemistry, pp. 347-349, 1994.
8. Dra Lida Obregon Planta medicinal y nutritive del Peru Dep. de Nutricion de UNA-LA MOLINA publicación 2015
9. Marín-Bravo, M. “Histologia de la lepidium meyenii “maca”, lepidium meyenii walpers (brassicaceae)” revista peruana de biología, 101 -1080, Facultad de ciencias biologicas, UNMSM, ,Tesis 2003.
10. Pino Figueroa, A. J., Guyen, N., . Maher, T. J. Neuro protective effects of *lepidium meyenii* (maca), 2010
11. Paz B. “Actividad protectora de los extractos de lepidium meyenii “maca” contra las neurotoxinas que ocasionan el alzheimer”- publicación UCSM 2016.
12. Zorrilla A, Fernández A. Diabetes mellitus y estrés oxidativo. Bioquimia 1999
13. Romero D, Calvo M, Villalba M, Amiguet J, Bueno J. Radicales libres y especies activadas del oxígeno. Química, biología e implicaciones en patología médica. Tesis 1987
14. Holgado M, Beluis M, Macías J. Características de los radicales libres. Rev esp geriatico gerontologico

15. Leibovitz B, Siegel B. Aspects of free radical reactions in biological systems. Thesis 1986
16. Borel J, Monboise J, Bellon G. Inflammation y radicales libres oMed sci 1988
17. Borel J, Randux A, Aquart F. Bioquímica dinámica publicación 1989;610-8
18. Sohal R, Bruk U. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and inflamation. exp med biologico 1989
19. Katz M, Robinson G. Nutritional influences on autooxidation, Free radicals, and degenerative diseases. Liss inc 1999
20. Maxwell S, Thomason H, Sandler D, Leguen C, Baxter M., Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Dep. escuela biomedical 1997;34(6):638-44.
21. Lin M, Beal M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress In neurodegenerative diseases. Nature 2006.
22. Olanow C., Arendash G. Metals and free radicals I Neurodegeneration. Curr opin neurol 1994;7(6):548-58
23. Dalle-donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella g, et al. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosativeStress in diseases: the contribution of redox proteomics. MassSpectrom rev 2005
24. Szweda P., Friguet B, Szweda Li. Proteolysis, free radicals And aging. Free radic biol med 2002.
25. Berciano Blanco J. Enfermedades degenerativas del sistema nervioso. Demencias. Enfermedad de alzheimer.. Medicina interna.15ª edición. Madrid,españa: editorial elseiver, 2006
26. Kettl P. Helping families with end-of-life care in alzheimer's disease. Comment in: j clin psychiatry. 2007
27. Geldmacher D. Differential diagnosis of dementia syndromes. Clin geriatr med. 2004
28. Jeffrey, MD, Frank JC. Guidelines for managing alzheimer's diseaseTreatment, 2002
29. Mahendra N. Exercise and behavioural management training improves physical health and reduces depression in people with alzheimer's disease, 2004
30. Luchsinger J. Dietary factors and alzheimer's disease. Lancet neurol oct 2004.

31. Romano M., enfermedad de alzheimer revista de posgrado de la cátedra de medicina. N° 175 – noviembre 2007
32. Shipley, M.; Mangold, C. A.; Szpara, M. L. Differentiation of the shsy5y human neuroblastoma cell line. J. Vis. Exp. 2016
33. Xie, H. R.; Hu, L. S.; Li, G. Y. Sh-sy5y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in parkinson's disease. Chin. Med. J. (engl). 2010
34. H. C. Mazzola, J. Medalie, M. Scherma, L. V. Panlilio, M. Solinas, G. Tanda, F. Drago, J. L. Cadet, S. R. Goldberg, and S. Yasar, fatty acid amide hydrolase (faah) inhibition enhances memory acquisition through activation of ppar-alpha nuclear receptors. Learn mem. 16, 332 (2009)
35. M. Seierstad and J. G. Breitenbucher, discovery and development of fatty acid amide hydrolase (faah) inhibitors. J. Med. Chem. 51, 7327(2008)
36. Venuprasad M., Kandikattu H. Kumar F. neuroprotective effects of hydroalcoholic extract of ocimum sanctum against h2o2 induced neuronal cell damage in sh-sy5y cells via antioxidative defence mechanism - springer science business media new york 2013
37. Rondón Ortiz, A. N.; Villanueva Sardón, R. J. “Efectos de isoniacida, vigabatrina, gabapentina y extracto pentánico de lepidium meyenii “maca” sobre los niveles de gaba producidos por neuroblastoma b35”, 2014
38. Taboada, K.; Tejeda, A. “estudio del efecto anticonvulsivante del extracto pentánico de *lepidium peruvianum chacón* sp. en ratas con epilepsia inducida por pilocarpina”, 2013
39. Rubio, J. Y W. Qiong, Aqueous extract of black lepidium meyenii “maca” (*lepidium meyenii*) on memory impairment induced by ovriectomy in mice, 2008. Yucra, s., and others effect of different fractions from hydroalcoholic extract of black lepidium meyenii “maca” (*lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats, 2008.
40. Stone, M., and others pilot investigation into the effect of lepidium meyenii “maca” supplementation on physical activity and sexual desire in sportsment.. 2009.
41. Barja G. Radicales libres de origen mitocondrial y longevidad. Analesranf 2005..
42. Agency for health care policy and research. Surgeon general reports Health service/techonology assesment text, 2007 .

43. Bernas T, Dobrucki J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of mtt: interaction of mtt with tmre, jc-1, and mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*. 2002.
44. Escobar L, Rivera A, Aristizabal F. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas, 2010.
45. Pino A., Nguyen D, Maher TJ. Neuroprotective effects of lepidium meyenii lepidium meyenii “maca”. *Annals of the new york academy of sciences* 1199, 77-85, (2010).
46. Mechoulam E., discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. *Prostaglandins leukot essent fatty acids* 66, 93(2002)
47. Schabitz F., Giuffrida, A. Berger A., Aschoff, M. Schwaninger, S. Schwab. Release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke: a microdialysis study. *Stroke* 33, 2112, (2002)
48. Hwang G. J., Adamson C., Butler D., Janero R., Makriyannis A. Enhancement of endocannabinoid signaling by fatty acid amide hydrolase inhibition: a neuroprotective therapeutic modality. *Life sci*. 86, 615 , (2010).
49. Mazzola H., J. Medalie, M. Scherma, L. V. Panlilio, M. Solinas, G. Tanda, F. Drago, J. L. Cadet, S. R. Goldberg. Fatty acid amide hydrolase (faah) inhibition enhances memory acquisition through activation of ppar-alpha nuclear receptors. *Learn mem*. 16, 332 (2009).
50. Seierstad M., Breitenbucher J, discovery and development of fatty acid amide hydrolase (faah) inhibitors. *J. Med. Chem*. 51, 7327(2008)
51. Gustavo F. Gonzalea, leonidas Villaorduñ, Manuel Gasco, Julio Rubio, Carla Gonzales lepidium meyenii “maca” (lepidium meyenii walp), una revisión sobre sus propiedades biológicas lepidium meyenii “maca” (lepidium meyenii walp), a review of its biological properties 2013..
52. Hansen H., Ikonomidou C. Bittigau, S. H. Hansen, and H. S. Hansen, accumulation of the anandamide precursor and other n-acylethanolamine phospholipids in infant rat models of in vivo necrotic and apoptotic neuronal death. *J. Neurochem*. 76, 39. (2001)

53. E. R. Mechoulam, discovery of endocannabinoids and some random thoughts on their possible roles in neuroprotection and aggression. Prostaglandins leukot essent fatty acids 66, 93 (2002)
54. W. R. Schabitz, a. Giuffrida, c. Berger, a. Aschoff, m. Schwaninger, s. Schwab, and d. Piomelli, release of fatty acid amides in a patient with hemispheric stroke: a microdialysis study. Stroke 33, 2112 (2002)
55. J. Hwang, C. Adamson, D. Butler, D. R. Janero, A. Makriyannis, and Bahr A., enhancement of endocannabinoid signaling by fatty acid amide hydrolase inhibition: a neuroprotective therapeutic modality. Life sci. 86, 615 (2010).
56. Hayflick L. Theories of aging. Fundamentals of geriatric medicine. New york:raven, 1983.
57. Cross C. The spectrum of disease. Oxygen radicals and human disease. Ann intern med 1987.
58. Southorn P, Lewis G. Free radicals in medicine i. Chem nat & biol reacction. Mayo clin proc 1988.
59. Packer L. Protective role of vitamin e in biological systems. Rev. nutr 1991.
60. Thiidus P. Effects of vitamine e deprivation and training on indices of tissue lipid peroxidation in rats. Med sci rep exerc 1991
61. Wayner D, Joyce A, Ingold K, Locke S. Quantitative measurement of the total peroxy radical- trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. Febs lett 1985..
62. Sugaya K., Chou S., Xu S., Mckinney M. Indicator of glial activation And brain oxidative stress after intraventricular infusion of an Endotoxin. Mol brain res 1998

ANEXO 1

**VWR International, L.P.**  
Centersqrd Bridgeport, NJ 08014 DEAR DR. JOVFFY Wave Carrier Lane  
CustomerService 1 800 932 5000 18F MASS 05K

**PACKING LIST**

DATE	SHIPPING REFERENCE NO.	TERMS	PURCHASE ORDER NUMBER
04/18/14	80145633031006	30 days net	50221

Account No: 0080066241 Sold To: MA COLLEGE OF PHARMACY  
179 LONGWOOD AVE BOSTON MA 02115-5804 US DAVID ALBERS

Account No: 0080195994 Ship To: MA COLLEGE OF PHARMACY  
179 LONGWOOD AVE BOSTON MA 02115-5804 US David Albers

LINE NO.	CASE I.D.	B/O QTY	ORDER QTY	SHIP QTY	UM	CATALOG NUMBER AND DESCRIPTION	PRICE	EXTENSION
100	88HW05		1	1	CS	WEB Order #: M2021508 29444-008 PLATE, BLK 96ML, STER, W/LID CS48 *** MFG NO. 3603 CountryCode: US Customs#: 392690 Total cases : 1		

**CERTIFICATION OF COMPLIANCE - The Company certifies that:**  
 It has purchased the above product(s) from the requested manufacturer or material source.  
 It has not altered or modified the product(s) in any manner from the original condition in which they were received from the manufacturer or material source.


MSDS Documents are Available on our Web Site [vwr.com](http://www.vwr.com)

SEE REVERSE FOR ADDITIONAL INFO

ZONE: 02

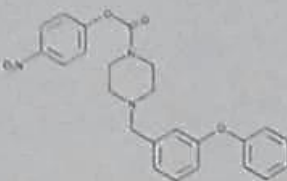
ANEXO 2

# Product Information



*Hold under license from The Scripps Research Institute*

<b>CAS Registry No.:</b>	1210004-12-8
<b>Internal Name:</b>	4-nitrophenyl-4-(3-phenoxybenzyl) piperazine-1-carboxylate
<b>MF:</b>	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
<b>FW:</b>	333.4
<b>Purity:</b>	≥98%
<b>Stability:</b>	≥2 years at -20°C
<b>Supplied as:</b>	A crystalline solid
<b>UV/Vis:</b>	λ <sub>max</sub> 273 nm



**Laboratory Procedures**

For long term storage, we suggest that JZL 195 be stored as supplied at -20°C. It should be stable for at least two years. JZL 195 is supplied as a crystalline solid. A stock solution may be made by dissolving the JZL 195 in the solvent of choice. JZL 195 is soluble in organic solvents such as DMSO and dimethyl formamide, which should be purged with an inert gas. The solubility of JZL 195 in these solvents is approximately 1.25 and 5 mg/ml, respectively.

If aqueous stock solutions are required for biological experiments, they can be prepared by diluting the organic solvent into aqueous buffers or isotonic saline. Ensure that the residual amount of organic solvent is insignificant, since organic solvents may have physiological effects at low concentrations. We do not recommend storing the aqueous solution for more than one day.

Fatty acid amide hydrolase (FAAH) and monoacylglycerol lipase (MAGL) mediate the hydrolysis of the endocannabinoids arachidonyl ethanolamide (AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG), respectively. JZL 195 is a potent inhibitor of both FAAH and MAGL (IC<sub>50</sub> = 2 and 4 nM, respectively).<sup>1</sup> It poorly inhibits neuropathy target esterase and ABHD6 and does not inhibit other brain serine hydrolases. JZL 195 displays time-dependent inhibition of FAAH and MAGL *in vivo*, consistent with a covalent mechanism of activation.<sup>1</sup> The *in vivo* inhibitory actions of JZL 195 against FAAH and MAGL are comparable to those of the selective inhibitors PF-3845 (Item No. 13279) and JZL 184 (Item No. 13158), respectively.<sup>1</sup> Through its inhibitory actions, JZL 195 simultaneously augments brain levels of AEA and 2-AG, producing antinociceptive, vasodilator, and hypomotility effects like those produced by direct CB<sub>1</sub> agonists.<sup>1</sup>

**Reference**

- Long, J.Z., Nomura, D.K., Vann, R.E., *et al.* Dual blockade of FAAH and MAGL identifies behavioral processes regulated by endocannabinoid crosstalk *in vivo*. *PNAS* **106**(48) 20270-20275 (2009).

**Related Products**

For a list of related products please visit: [www.caymanchem.com/catalog/12664](http://www.caymanchem.com/catalog/12664)

**WARNING: THIS PRODUCT IS FOR LABORATORY RESEARCH ONLY! NOT FOR ADMINISTRATION TO HUMANS! NOT FOR HUMAN OR VETERINARY DIAGNOSTIC OR THERAPEUTIC USE.**

**SAFETY DATA**

1. The supplier should be consulted for more information on the primary hazards associated with this reagent. Do not ingest, inhale, or swallow. Do not get in eyes, on skin, or on clothing. Wash thoroughly after handling. This information contains safety, health, and environmental information for the safe and proper use of this material. Refer to the user guide review the complete Safety Data Sheet, which has been provided to your institution.

**WARRANTY AND LIMITATION OF REMEDY**

1. Cayman Chemical Company makes no warranty as to purity, quality, or use, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

2. Cayman Chemical Company does not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

3. The information on this label does not apply to the use of this material in any other jurisdiction or for any other purpose than that for which it is intended.

4. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

5. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

6. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

7. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

8. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

9. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

10. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

11. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

12. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

13. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

14. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

15. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

16. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

17. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

18. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

19. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

20. Cayman Chemical Company and its subsidiaries do not warrant the safety, effectiveness, or quality of any product, whether written or oral, expressed or implied, including without limitation, any warranty of fitness for a particular purpose, merchantability, and non-infringement, which extends beyond the description of the material found on Cayman Chemical's website only to the original purchaser of the material who has purchased the material from Cayman Chemical Company.

Copyright Cayman Chemical Company 06/2010/014

**Cayman Chemical**

**Mailing address**  
1180 E. Ellsworth Road  
Ann Arbor, MI  
48108 USA

**Phone**  
(800) 364-9897  
(734) 971-3335

**Fax**  
(734) 971-3640

**E-Mail**  
custserv@caymanchem.com

**Web**  
www.caymanchem.com

### ANEXO 3

Software Version: 2.05.5  
 Experiment File Path:  
 Protocol File Path:  
 Plate Number: Plate 3  
 Date: 13/07/2015  
 08:20:17  
 Time: a.m.  
 Reader Type: Synergy HT  
 Reader Serial  
 :Number: 1405237  
 Reading Type: Reader

#### Procedure Details

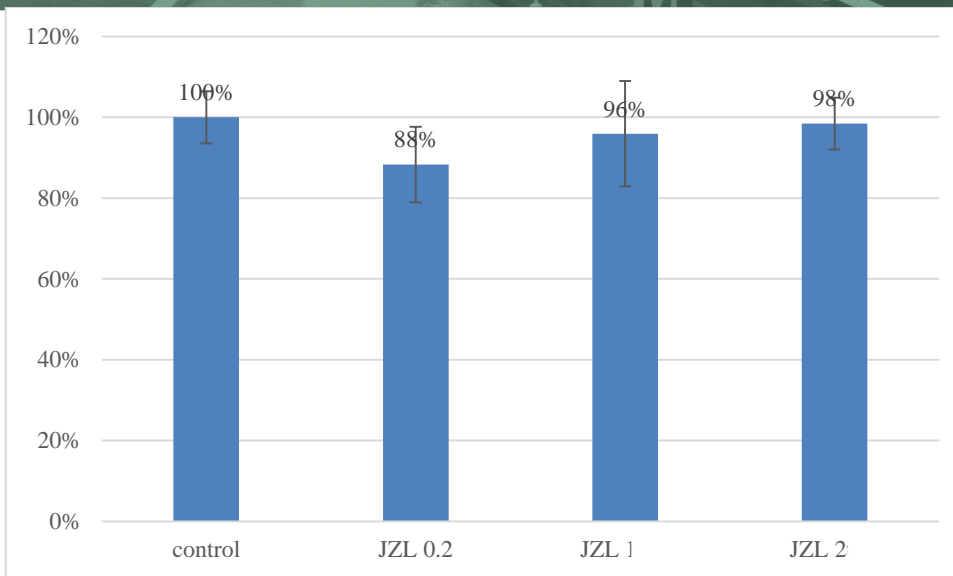
Plate Type: 96 WELL PLATE  
 Read: Absorbance Endpoint  
 Full Plate  
 Wavelengths: 490  
 Read Speed: Normal

#### Results

Actual Temperature: 22.3

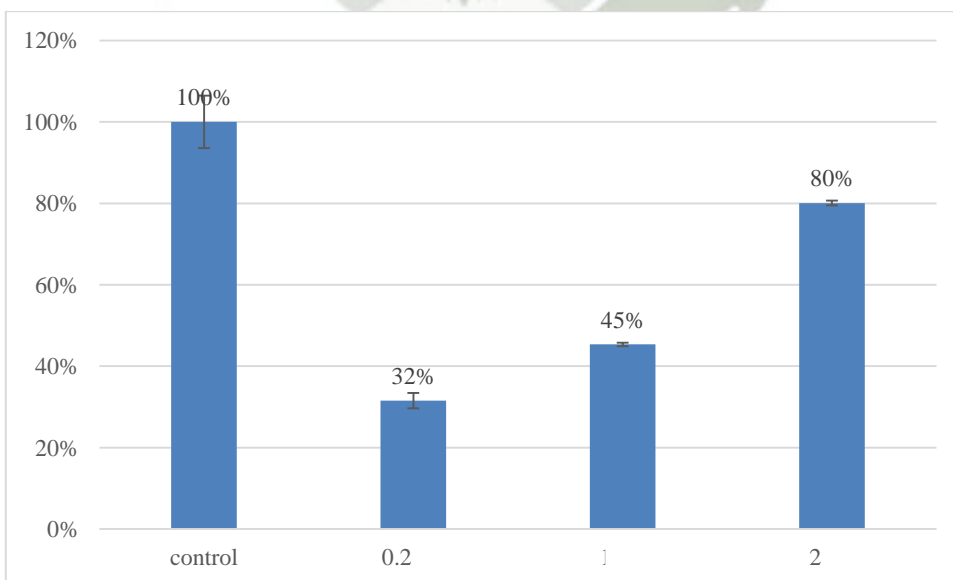
		control	0.2	1	2	control per	0.2	1	2	
	0.045	0.045	0.043	0.043	0.044	0.045	0.045	0.043	0.044	490
JZL	0.046	0.322	0.278	0.272	0.308	0.322	0.099	0.152	0.271	490
	0.045	0.325	0.279	0.344	0.351	0.325	0.111	0.154	0.269	490
	0.045	0.361	0.333	0.351	0.333	0.361	0.108	0.151	0.267	490
control amz	0.046	0.322	0.134	0.167	0.256	0.037	0.044	0.045	0.047	490
	0.045	0.325	0.123	0.152	0.279	0.04	0.046	0.045	0.046	490
	0.045	0.361	0.114	0.154	0.258	0.046	0.045	0.043	0.045	490
	0.045	0.047	0.045	0.043	0.045	0.045	0.044	0.044	0.045	490

JZL	control	JZL 0.2	JZL 1uM	JZL 2uM
	0.322	0.278	0.272	0.308
	0.325	0.279	0.344	0.351
	0.361	0.333	0.351	0.333
AVERAGE	0.336	0.296667	0.322333	0.330667
JZL	control	JZL 0.2	JZL 1uM	JZL 2uM
	96%	83%	81%	92%
	97%	83%	102%	104%
	107%	99%	104%	99%
AVERAGE	100%	88%	96%	98%
SD	6%	9%	13%	6%
SEM	3%	4%	5%	3%



lepidium meyenii "maca" PERU	control	0.2ppm	1ppm	2ppm
	0.322	0.099	0.152	0.271
	0.325	0.111	0.154	0.269
	0.361	0.108	0.151	0.267
AVERAGE	0.336	0.106	0.152333	0.269

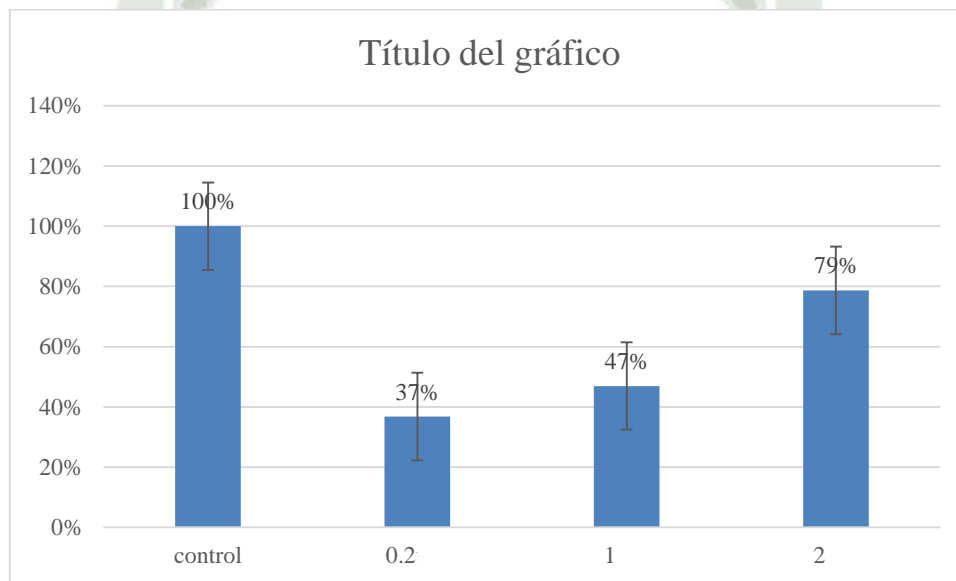
lepidium meyenii "maca" PERU	control	0.2ppm	1ppm	2ppm
	96%	29%	45%	81%
	97%	33%	46%	80%
	107%	32%	45%	79%
AVERAGE	100%	32%	45%	80%
SD	6%	2%	0%	1%
SEM	3%	1%	0%	0%



lepidium meyenii "maca" AMAZON	control	0.2ppm	1ppm	2ppm
	0.322	0.134	0.167	0.256
	0.325	0.123	0.152	0.279
	0.361	0.114	0.154	0.258

AVERAGE 0.336 0.123667 0.157667 0.264333

lepidium meyenii "maca" AMAZON	control	0.2ppm	1ppm	2ppm
	96%	40%	50%	76%
	97%	37%	45%	83%
	107%	34%	46%	77%
AVERAGE	100%	37%	47%	79%
SD	6%	3%	2%	4%
SEM	3%	1%	1%	2%



## ANEXO 4

### DILUCIONES DE PERÓXIDO DE HIDROGENO PARA ENSAYOS DE VIABILIDAD

Solución Stock de peróxido de hidrógeno (densidad= 1.40 g/mL; Concentración= 50 % P/P)

1. Calculo para transformar de porcentaje a molaridad

$$0.5 \times 1.4 \frac{g}{mL} \times \frac{1 \text{ mol}}{34 g} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1L} = 20.58 M$$

El peróxido de hidrógeno al 50 % P/P equivale a una concentración de 20.58 M

2. Preparación de una solución de peróxido de hidrógeno 0.1 M (100 mM)

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V \times 20.58 = 0.1 M \times 10 \text{ mL}$$

$$V = 48.5 \mu L$$

3. Preparación de una solución de peróxido de hidrógeno 50  $\mu$ M

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

$$V \times 100 \text{ mM} = 50 \text{ mM} \times 10 \text{ mL}$$

$$V = 5 \mu L$$

4. Preparación de diluciones de peróxido de hidrógeno para obtener concentraciones de 1.0 mM, 3.0 mM, 5.0 mM y 10.0 mM hasta un volumen de dilución de 1 mL (1000  $\mu$ L)

$$V \times 50 \text{ mM} = 1 \text{ mM} \times 1000 \mu L$$

$$V = 20 \mu L$$

$$V \times 50 \text{ mM} = 3 \text{ mM} \times 1000 \mu L$$

$$V = 60 \mu L$$

$$V \times 50 \text{ mM} = 5 \text{ mM} \times 1000 \mu L$$

$$V = 100 \mu L$$

$$V \times 50 \text{ mM} = 10 \text{ mM} \times 1000 \mu L$$

$$V = 200 \mu L$$

**Preparación de soluciones de 0.2, 1.0 y 2.0 ppm de lepidium meyenii “maca” a partir de una solución stock de lepidium meyenii “maca” de 300 ppm**

\*Se disolvió 30mg del extracto en 100ml.

1. Preparación de una solución madre de lepidium meyenii “maca” a una concentración de 200 ppm

$$V \times 300 \text{ ppm} = 200 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V = 3.3 \text{ mL}$$

2. Preparación de soluciones de 4, 20 y 40 ppm a partir de la solución de 200 ppm.

$$V \times 200 \text{ ppm} = 4 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V = 100 \text{ } \mu\text{L}$$

$$V \times 200 \text{ ppm} = 20 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V = 500 \text{ } \mu\text{L}$$

$$V \times 200 \text{ ppm} = 40 \text{ ppm} \times 5 \text{ mL}$$

$$V = 1000 \text{ } \mu\text{L}$$

3. Preparación de diluciones de 0.2, 1.0 y 2.0 ppm de *lepidium meyenii* “maca” a partir de las soluciones anteriores

0.2 ppm

$$V \times 4 \text{ ppm} = 0.2 \text{ ppm} \times 200 \text{ } \mu\text{L}$$

$$V = 10 \text{ } \mu\text{L}$$

1.0 ppm

$$V \times 20 \text{ ppm} = 1.0 \text{ ppm} \times 200 \text{ } \mu\text{L}$$

$$V = 10 \text{ } \mu\text{L}$$

2.0 ppm

$$V \times 40 \text{ ppm} = 2.0 \text{ ppm} \times 200 \text{ } \mu\text{L}$$

$$V = 10 \text{ } \mu\text{L}$$