

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría de Bioquímica y Biología Molecular



“EFECTO DE LOS EXTRACTOS PENTÁNICOS DE *Lepidium meyenii* L.
(MACA) Y DE N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y EXPUESTAS AL PÉPTIDO β
AMILOIDE ”

Tesis presentada por la Bachiller:

**De La Fuente Torres Mocita Heset
Lourdes**

Para optar el Grado Académico de:

**Maestro en Bioquímica y Biología
Molecular**

Asesor:

Dr. Villanueva Salas José

AREQUIPA – PERU

2018



Universidad Católica de Santa María

☎ (5154)251210 📠 (5154)251213 ✉ ucsm@ucsm.edu.pe 🌐 <http://www.ucsm.edu.pe> 📍 Apto. 1350
AREQUIPA – PERÚ

"En la Ciencia y en la Fe esta nuestra Fortaleza para mayor Gloria de Dios"

Arequipa, 11 de octubre del 2018

Señor Doctor,
José A. Villanueva Salas
Director de la Escuela de Postgrado,
Universidad Católica de Santa María.
Presente.

Ref.: Dictamen de Borrador de Tesis – Expediente 45340

De mi consideración,

Me es grato dirigirme a Ud. con el fin de saludarlo atentamente y en atención al nombramiento como DICTAMINADOR del Borrador de Tesis titulado **"EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE LEPIDIUM MEYENII (MACA) Y DE LAS MACAMIDAS SINTETICAS SOBRE LA PRODUCCION DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS) EN CELULAS DE NEUROBLASTOMA B-35 EXPUESTAS AL PEPTIDO BETA AMIELOIDE"** con el que la bachiller **Mocita Heset Lourdes De La Fuente Torres**, pretende optar el Grado Académico de **Maestro en Bioquímica y Biología Molecular**, debo mencionar que realizadas las correcciones y sugerencias correspondientes, las mismas que han sido salvadas satisfactoriamente, considero se encuentra **APTO** para continuar con los tramites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela de Postgrado.

Atentamente,



José A. Villanueva Salas, PhD
Docente
Escuela de Postgrado



Dr. Hugo Tejada Pradell
Docente
Escuela de Postgrado



Dr. Cesar Bernabe Ortiz
Docente
Escuela de Postgrado

DEDICATORIA

A Dios, gracias por darme las fuerzas y el ánimo cuando lo necesito, y la ayuda para poder sobrellevar todo lo que está a mi cargo.

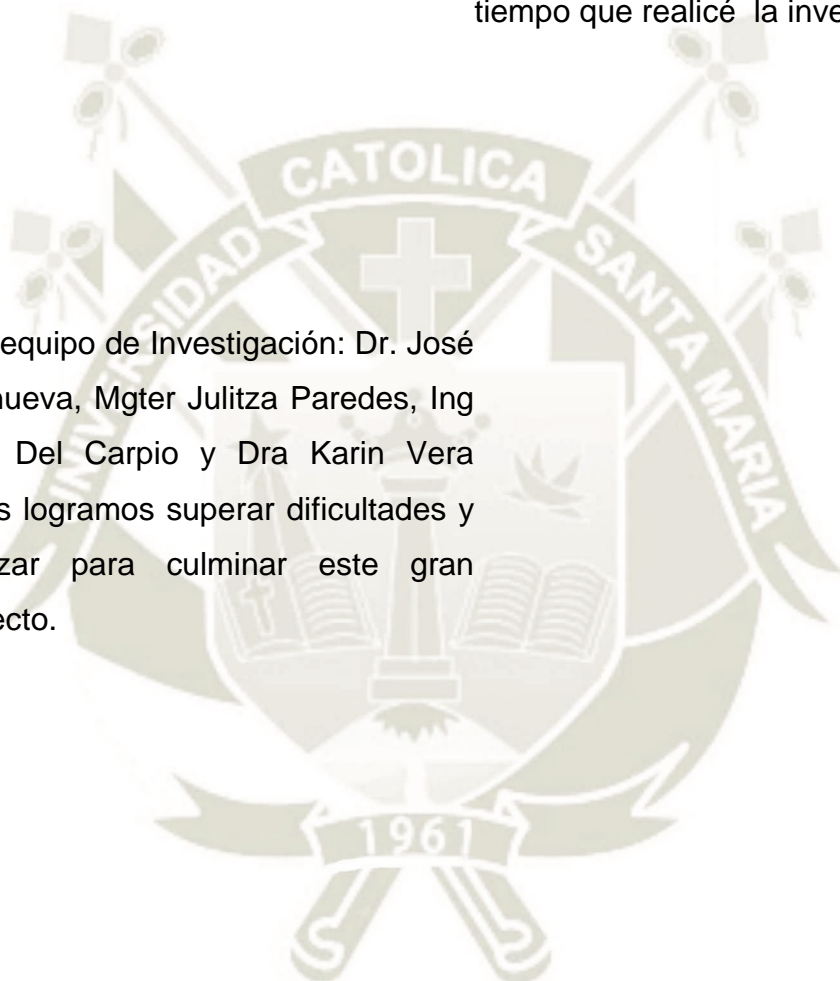
A mi esposo Carlitos que con su tranquilidad y buen humor que contagia, me ayudó a superar dificultades propias del trabajo.

A mis hijitos Diego y Gabriel, con Diego empezó este sueño con Gabriel terminó, gracias por ser un estímulo en mi vida para ser cada día mejor.

AGRADECIMIENTOS

A Lily, Martita, Heradio y Mariana gracias por su apoyo incondicional en todo el tiempo que realicé la investigación

A mi equipo de Investigación: Dr. José Villanueva, Mgter Julitza Paredes, Ing José Del Carpio y Dra Karin Vera juntos logramos superar dificultades y avanzar para culminar este gran proyecto.



INTRODUCCION

Actualmente en el Perú y el mundo se ha observado un incremento del grupo etario considerado adulto mayor, con cifras que aumentarán en un 22 % comparado con los valores actuales según la organización Mundial de la Salud, por lo que la expectativa de vida también será superior a los setenta años.

Es de esperarse entonces que las enfermedades presentes en este grupo poblacional también se vean incrementadas. Siendo las enfermedades neurodegenerativas una de las principales causas de mortalidad de las personas consideradas adultas mayores. Además de la edad existen factores externos e internos que predisponen al desarrollo de estas enfermedades como son : el ritmo de vida que implica hábitos alimenticios inadecuados, vida sedentaria , estrés laboral , y la presencia de genes relacionados con este tipo de enfermedades que en algunos casos generan inicios tempranos de estas patologías.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las causas más comunes de pérdida de la memoria, se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas hecho que puede estar relacionado con la disminución significativa del volumen del cerebro afectando la sinapsis nerviosa y produciendo a largo plazo un deterioro de las células neuronales. Las causas principales que originan esta enfermedad son: la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares en el cerebro que se compone de proteína Tau hiperfosforilada, y la presencia de placas seniles compuestas de péptido β amiloide de ubicación extracelular, que impide la sinapsis nerviosa.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son moléculas que se generan en el metabolismo que sufre el oxígeno, en condiciones normales sus valores se encuentran bajos, gracias al equilibrio existente entre la tasa de producción y tasa de eliminación por medio de antioxidantes y enzimas relacionadas.

Las especies reactivas de oxígeno (EROs) en la enfermedad de Alzheimer (EA) comienzan a oxidar a biomoléculas de la membrana neuronal, como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, dando como resultado la alteración de la integridad de la membrana y la funcionalidad de las proteínas. Se ha informado que los niveles elevados de péptido β amiloide se asocian con mayores niveles de producción de oxidación a partir de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, por ende se puede decir que este péptido es precursor de las especies reactivas de oxígeno.

Los ensayos de cultivo celular permiten investigar el efecto de distintas moléculas en diferentes tipos de células bajo condiciones que pueden ser controladas. En el presente trabajo se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y para determinar el efecto del extracto pentánico de *Lepidium meyeri* L. (maca), planta cultivada en las zonas alto andinas del Perú, y de la macamida sintética N-benciloctadienildecanamida sobre la producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs) expuestas al péptido β amiloide a diferentes concentraciones.

En varias investigaciones realizadas en el Perú y a nivel mundial mencionan las propiedades farmacológicas de la maca, como el incremento de la función sexual, el aumento de la espermatogénesis, el efecto antioxidante, y el incremento de funciones cognitivas como el aprendizaje espacial y memoria.

La determinación de EROs se realizó con un método que mide la fluorescencia emitida del etidium agente intercalante del DNA que se origina de la oxidación del dihydroetidium en presencia del anión superóxido, una de las especies reactivas de oxígeno más representativa a nivel intracelular en la enfermedad de Alzheimer.

RESUMEN

Lepidium meyenii L o maca como comúnmente se le conoce, es una planta que crece en las zonas alto andinas del país. A esta planta se le atribuyen diferentes efectos benéficos para la salud. Se conocen tres variedades o ecotipos que han sido clasificadas de acuerdo al color que presentan las raíces o hipocótilos como son: la maca negra, roja y amarilla.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de los extractos pentánicos de *Lepidium meyenii* L (Maca) y de la macamida sintética N-bencil-octadienildecanamida sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestas al péptido β amiloide, agente causante de las placas seniles presentes en los cerebros de personas que padecen la enfermedad de Alzheimer, éstas placas evitan la sinapsis nerviosa y en consecuencia se produce la pérdida de la memoria. El péptido β amiloide puede desencadenar la oxidación de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos presentes en la membrana celular de las neuronas por aumento del anión superóxido, considerado como una de las principales especies reactivas de oxígeno (EROs).

Se utilizaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y que fueron expuestas a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y péptido β amiloide en intervalos de tiempo de 30 min , 1 hora y 2 horas , con la finalidad de establecer la dosis de peróxido de hidrógeno y péptido β amiloide que genera mayor porcentaje de especies reactivas de oxígeno y así poder compararlos .

Las células también fueron expuestas a distintas concentraciones de los extractos pentánicos de cada maca y la macamida sintética N-bencil-octadienildecanamida durante 24 horas, para después evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno mediante el método de oxidación del dihydroethidium por acción del anión superóxido, Por último las células fueron pretratadas con los extractos pentánicos de cada maca y de la macamida sintética N-bencil-octadienildecanamida durante 24 horas, para posteriormente

inducir la producción de especies reactivas de oxígeno con la aplicación del péptido β amiloide .

Como resultado se observó que la concentración de peróxido de hidrógeno y péptido β amiloide que generaron una mayor producción de especies reactivas de oxígeno fue de 100 μ M y 1 μ M respectivamente en el intervalo de 1 hora, siendo mayor el porcentaje de EROs en las células tratadas con el péptido β amiloide. Los extractos pentánicos de las distintas variedades de maca en las concentraciones menores a 25 ppm produjeron una disminución significativa del porcentaje de especies reactivas de oxígeno en 24 horas de exposición solas.

Los extractos pentánicos de la maca negra y amarilla demostraron tener mejor efecto protector a una concentración de 0.5 ppm en comparación con la maca roja, después de la exposición de las células al péptido β amiloide durante una hora, debido a que el porcentaje de especies reactivas de oxígeno disminuyó de manera significativa. La macamida sintética N-benciloctadienildecanamida concentraciones menores de 10 μ M redujó la producción de especies reactivas de oxígeno significativamente en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y después de la 1 hora de exposición al péptido β amiloide

Por lo que se concluye que los extractos pentánicos de la maca y la macamida sintética N-benciloctadienildecanamida pueden influir en la disminución de las especies reactivas de oxígeno en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestas al péptido β amiloide.

Palabras claves: Alzheimer, Maca, péptido β amiloide, Especies reactivas de oxígeno.

ABSTRACT

Lepidium meyenii L or maca as it is commonly known, is a plant that grows in the high Andean areas of the country. To this plant different beneficial effects for the health are attributed to him. Three varieties or ecotypes are known that have been classified according to the color that you present the roots or hypocotyls such as: black, red and yellow maca.

The objective of this study was to evaluate the effect of the pentane extracts of *Lepidium meyenii* L. (Maca) and of the synthetic macamide N-benzyl-octadienildecánamide on the production of reactive oxygen species (ROS), in human neuroblastoma cells SH-SY5Y exposed to the amyloid β peptide, the causative agent of senile plaques present in the brains of people suffering from Alzheimer's disease, these plaques avoid the nervous synapse and consequently the loss of memory occurs. The amyloid β peptide can trigger the oxidation of proteins, lipids and nucleic acids present in the cell membrane of neurons by increasing the superoxide anion, considered one of the main reactive oxygen species (EROs).

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells that were exposed to different concentrations of hydrogen peroxide and β -amyloid peptide were used at time intervals of 30 min, 1 hour and 2 hours, in order to establish the dose of hydrogen peroxide and peptide β amyloid that generates a higher percentage of reactive oxygen species and thus be able to compare.

The cells were also exposed to different concentrations of the pentane extracts of each maca and the synthetic macamide N-benzyl-octadienildecánamide for 24 hours, to then evaluate the production of reactive oxygen species by the method of oxidation of dihydroethidium by the action of superoxide anion. Finally, the cells were pretreated with the pentane extracts of each maca and the synthetic macamide N-benzyl-octadienylcanamide for 24 hours, to subsequently induce the production of reactive oxygen species with the application of amyloid β -peptide.

As a result, it was observed that the concentration of hydrogen peroxide and β -amyloid peptide that generated a higher production of reactive oxygen species was 100 μ M and 1 μ M respectively in the 1 hour interval, with the percentage of EROs in the treated cells being higher. with the amyloid β peptide. The pentane extracts of the different varieties of maca at concentrations below 25 ppm produced a significant decrease in the percentage of reactive oxygen species in 24 hours of exposure alone.

The pentane extracts of the black and yellow maca were shown to have a better protective effect at a concentration of 0.5 ppm compared to red maca, after exposure of the cells to amyloid β peptide for one hour, because the percentage of reactive species of oxygen decreased significantly. Synthetic macamide N-benzyloctadienylcanamide at concentrations lower than 10 μ M reduced the production of reactive oxygen species significantly in human neuroblastoma cells SH-SY5Y after 1 hour of exposure to amyloid β -peptide

It is concluded that the pentane extracts of maca and syntactic macamide N-benzyloctadienylcanamide can influence the decrease of reactive oxygen species in human neuroblastoma SH-SY5Y cells

Key Words: Alzheimer, Maca, β amyloid peptide, Reactive oxygen species

INDICE GENERAL

INTRODUCCION

RESUMEN

ABSTRACT

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS

HIPOTESIS

OBJETIVOS

CAPITULO I

I.	MARCO TEORICO	1
1.	ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	1
1.1.	Definición	1
1.2.	Etiología y fisiopatología de la enfermedad.....	2
1.2.1.	Péptido β amiloide ($A\beta$)	2
1.2.2.	Genética de la Enfermedad.	4
1.2.3.	Síntomas, signos y Diagnóstico	4
1.2.4.	Pronóstico y Tratamiento	6
2.	ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)	6
2.1.	Principales especies reactivas de oxígeno	8
2.1.1.	Anión superóxido (O_2^-)	8
2.1.2.	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	9
2.1.3.	Radical Hidroxilo (OH^\cdot).....	10
3.	RELACION DEL ESTRÉS OXIDATIVO CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	11
3.1.	Peroxidación de lípidos.	12
3.2.	Oxidación de proteínas	13
3.3.	Oxidación del ADN y ARN.....	13
3.4.	Sistema de defensa para las especies reactivas de oxígeno	14
4.	METODOS EMPLEADOS PARA MEDIR EL ESTRÉS OXIDATIVO	16
4.1.	Determinación De Glutation	16
4.2.	Determinación de Peroxidación Lípidica	17
4.3.	Determinación de Superóxido	18
4.4.	Determinación de Peróxido de Hidrógeno	19

5.	CULTIVO CELULAR	21
5.1.	Cultivo primario.	22
5.2.	Línea primaria.....	22
5.3.	Línea celular continúa.	22
5.4.	Células de neuroblastoma SH-SY5Y	22
5.5.	Medio de Cultivo	23
6.	<i>Lepidium meyenii</i> L. (MACA).....	23
6.1.	Composición Química	24
6.1.1.	Metabolitos Secundarios	26
6.2.	Efectos Biológicos de la Maca	28

CAPITULO II

II.	MATERIALES Y METODOS.....	30
1.	MATERIALES.....	30
1.1.	MATERIAL BIOLÓGICO.	30
1.1.1.	NEUROBLASTOMA SH-SY5Y	30
1.1.2.	EXTRACTO PÉNTANICO DE <i>Lepidium meyenii</i> L (Maca).....	31
1.2.	MATERIALES Y REACTIVOS	31
1.2.1.	Equipos utilizados.	31
1.2.2.	Reactivos	31
1.2.3.	Materiales descartables y de vidrio	32
1.3.	LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	32
2.	MÉTODOLÓGÍA.....	32
2.1.	CULTIVO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y	32
2.1.1.	Procedimiento para generar un nuevo pasaje	33
2.1.2.	Procedimiento para el conteo de células viables	36
2.2.	ENSAYO PARA DETERMINAR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS)	38
2.2.1.	MÉTODO GENERAL PARA DETERMINAR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS).....	41
2.2.2.	DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LAS DISTINTAS VARIEDADES DE <i>Lepidium meyenii</i> L. (Maca)	42

2.2.3. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LA N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA	44
2.2.4. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO PRODUCIDO POR EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	44
2.2.5. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS OXÍGENO PRODUCIDO POR EL PÉPTIDO β AMILOIDE	46
2.2.6. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LAS TRES VARIEDADES DE <i>Lepidium meyenii</i> L. (Maca) Y AL PÉPTIDO β AMILOIDE	62
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63

CAPÍTULO III

III. RESULTADOS Y DISCUSION.....	48
1. CULTIVO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y.....	48
2. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LAS DISTINTAS VARIEDADES DE MACA Y MACAMIDA SINTETICA N-BENCILOCTADIENILOCTADECANAMIDA	49
3. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO PRODUCIDO POR EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO.....	55
4. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO PRODUCIDO POR EL PÉPTIDO β AMILOIDE	59
5. EVALUACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENOS EN CELULAS PRETRATADAS CON EXTRACTO DE MACA Y LA MACAMIDA SINTETICA N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA Y PEPTIDO β AMILOIDE	62

CAPITULO IV

CONCLUSIONES.....	69
SUGERENCIAS	70
REFERENCIAS.....	71
ANEXOS.....	81

INDICE DE FIGURAS

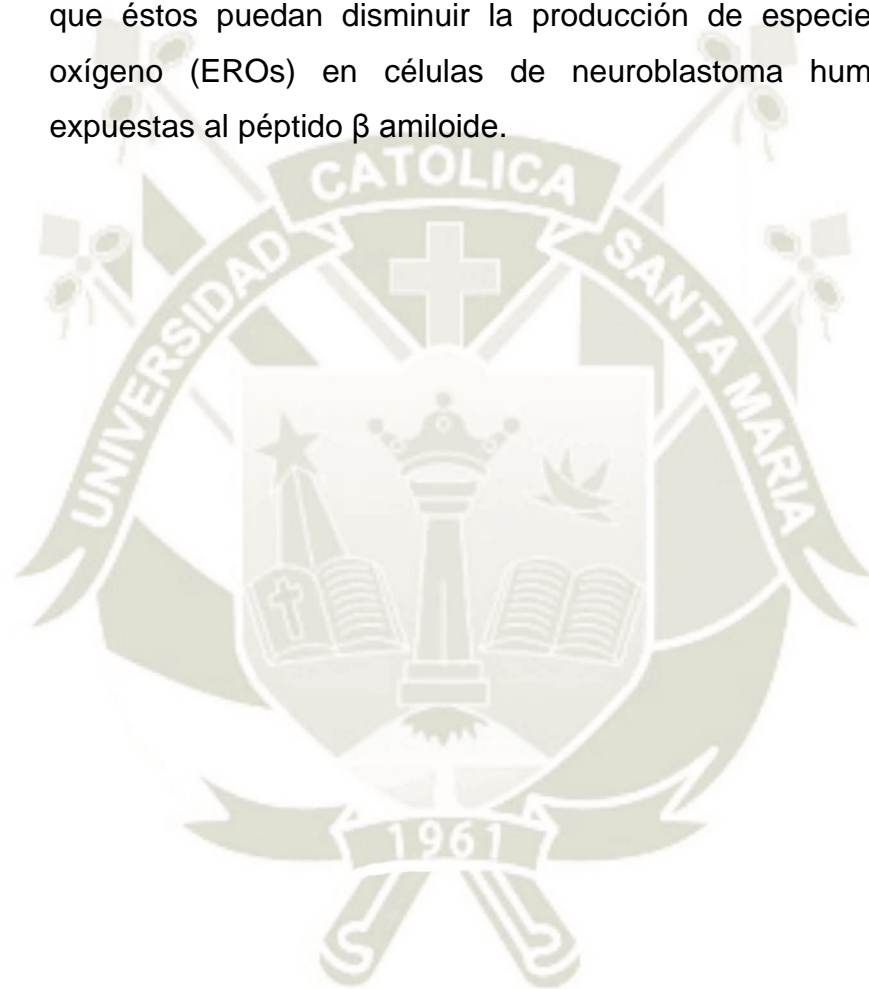
Figura N° 1 Mecanismo de formación del péptido β amiloide	3
Figura N° 2 : Clasificación genotípica de los diferentes tipos de enfermedad de Alzheimer	5
Figura N° 3 Estructuras electrónicas de especies de oxígeno reactivas comunes. Cada estructura cuenta con su nombre y fórmula química. El rojo • designa un electrón desapareado.....	7
Figura N°4 Mecanismo de formación de las especies reactivas de oxígeno	11
Figura N° 5 Mecanismo de formación de peroxidación lipídica.....	13
Figura N° 6 Determinación de malondialdehído con ácido barbitúrico.....	17
Figura N°7 : Determinación de anión superóxido con método de dihidroetidio.....	18
Figura N°8 Determinación de peróxido con MITOSOX	19
Figura N° 9 : Determinación de Peróxido de hidrógeno con resorufina	20
Figura N° 10: Determinación de Peróxido de hidrógeno con el reactivo 2,7-Diclorodihidrofluorescein diacetate (DCFHDA)	20
Figura N° 11: Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y	23
Figura N° 12: Hipocotilos de Maca Roja, Negra y Amarilla	25
Figura N°13: Macamidas Sintéticas	27
Figura N° 14 : Cuantificación de células viables utilizando el citometro de Flujo.....	35
Figura N° 15 : Procedimiento para la cuantificación de células viables	35
Figura N° 16: Determinación de las especies reactivas de oxígeno utilizando el citometro de Flujo	37
Figura N° 17 Procedimiento para la determinación de las especies reactivas de oxígeno (EROs).....	38
Figura N° 18 Células de Neuroblastoma Humano SH-SY5Y a una confluencia de 80 %	49
Figura N° 19 : EROs producido por peróxido de hidrógeno en diferentes periodos de exposición	57
Figura N° 20 Porcentaje de EROs vs Concentración del Péptido β amiloide	60
Figura N° 21 Porcentaje de especies reactivas de oxígeno en células de neuroblastoma Humano SH-SY5Y pretratadas con diferentes macas	63

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1 : Clasificación Taxonómica de <i>Lepedium meyenii</i> L (Maca)	25
Tabla N° 2 : Composición Química de <i>Lepedium meyenii</i> L (Maca)	26
Tabla N° 3: Preparación de las soluciones de los extractos de maca	39
TABLA N° 4 : Preparación de las soluciones de la macamida sintética N-bencil- octadienildecanamida	41
Tabla N° 5: Preparación de las soluciones de peróxido de hidrógeno	42
Tabla N° 6: Preparación de las soluciones del péptido β amiloide	45
Tabla N° 7: Porcentaje de Especies reactivas de oxígeno a 24 horas de exposición con las distintas variedades de maca.....	45
Tabla N° 8: Anova para la evaluación de las Concentraciones dentro de un mismo grupo	51
Tabla N° 9: Análisis de comparaciones múltiples entre concentraciones del mismo grupo.....	52
Tabla N° 10: Anova para comparación de macas	53
Tabla N° 11 Anova para el porcentaje de eros en células expuestas peróxido de hidrógeno en diferentes periodos de tiempo	54
Tabla N° 12 Análisis de Comparaciones múltiples para periodos de exposición al peróxido de hidrógeno	55
Tabla N° 13: Anova para las concentraciones de peróxido de hidrógeno	55
Tabla N° 14 Comparación de concentraciones de peróxido de hidrógeno en cada periodo de exposición	56
Tabla N° 15 Anova del porcentaje de EROS en células expuestas en diferentes periodos de tiempo al peptido β amiloide	58
Tabla N° 16 : Comparación de concentraciones del péptido β amiloide en cada periodo de exposición	60
Tabla N° 17: Porcentaje de especies reactivas de oxígeno en células de neuroblastoma pretratadas con diferentes maca	61
Tabla N°18: Anova para la evaluación de las especies reactivas de oxígeno en células pretratadas con extracto de maca y la macamida sintética N- benciloctadienildecanamida expuestas al peptido β amiloide	62
Tabla N°19 : Comparaciones múltiples células pretratadas con extracto de maca y macamida sintética expuestas al peptido β amiloide	64

HIPOTESIS

Dado que los extractos pentánicos de *Lepidium meyenii* L. (Maca) y de algunas macamidas sintéticas como N-benciloctadienildecanamida han demostrado tener efecto neuroprotector frente a la acción del péptido β amiloide en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y, es probable que éstos puedan disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestas al péptido β amiloide.



OBJETIVOS

General

- Evaluar el efecto de los extractos de *Lepidium meyenii* L.(Maca) y de la macamida sintética N-benciloctadienildecanamida, sobre la producción de especies reactivas de oxígeno , en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestas al péptido β amiloide

Específicos

- Determinar el efecto de los extractos pentánicos de *Lepidium meyenii* L.(Maca), en la producción de las especies reactivas de oxígeno en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
- Determinar el efecto de una macamida sintética N-bencil-octadienildecanamida en la producción de las especies reactivas de oxígeno, en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y .
- Determinar el efecto del péptido β amiloide a diferentes concentraciones sobre la producción de las especies reactivas de oxígeno en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

CAPITULO I

I. MARCO TEORICO

1. ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

1.1. DEFINICIÓN

En los últimos años se ha visto un incremento de las enfermedades de tipo neurodegenerativas, ya sea por el estilo de vida de las personas, o por factores genéticos que pueden desencadenar la presencia de enfermedades como Parkinson, Alzheimer, Epilepsia etc.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas hecho que puede estar relacionado con la disminución significativa del volumen del cerebro de pacientes que presentan la enfermedad en comparación con pacientes sanos ^{1, 2}. La atrofia es el resultado de la degeneración de las sinapsis y la muerte de las neuronas, en particular en el hipocampo ³, la región del cerebro que juega un papel muy importante en la memoria y la orientación espacial. La edad es el factor de riesgo más alto para la EA, el riesgo de desarrollar la enfermedad alcanza el 50% para las personas mayores de 85 años ⁴.

En la enfermedad de Alzhéimer no solo existen alteraciones cognitivas (memoria, inteligencia general, pensamiento abstracto y operativo, lenguaje, praxis, gnosia), sino también se encuentran conductuales (psicomotricidad consciente, emociones, conducta relacional, sueño, alimentación, personalidad, carácter) y funcionales (psicomotricidad inconsciente, marcha, capacidad de desenvolvimiento en la vida diaria)⁵.

En el año 2015, de acuerdo con el World Alzheimer Report ⁶ se estimó que 46.8 millones de personas sufrían de demencia, cifra que puede llegar a duplicarse en los próximos 20 años ⁶. Aproximadamente el 5-8% de las

personas mayores de 65 años, el 15-20% mayor de 75 años y el 25-50% mayor de 85 años se ven afectados por la demencia ⁷. La mayor prevalencia se encuentra en Asia (22,9 millones de personas), mientras que Europa y las Américas representan 10,5 y 9,4 millones de personas, respectivamente. EA es la forma más común de demencia, que representa el 50-75% de todas las demencias ⁷. La duración de la enfermedad de (EA) suele ser de 8 a 10 años, con un rango de 2 a 25 años después del diagnóstico. ⁸

1.2. ETIOLOGIA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

Mediante estudios anatómo histológicos de cerebros de personas con alzhéimer se ha observado la presencia de placas amiloides llamadas “**placas seniles**” descritas por primera vez por Alois Alzheimer. Estas placas, se encuentran en el espacio extracelular del cerebro de una persona enferma y están particularmente presentes en la región del hipocampo. Estas placas se componen principalmente de un péptido llamado β Amiloide ($A\beta$), que se agrega y forma principalmente por fibrillas ricas en lámina β . ^{2,9} Otro rasgo distintivo de la enfermedad es la presencia de ovillos neurofibrilares intracelulares en el cerebro ¹⁰ y se compone de proteína Tau hiperfosforilada. ¹¹ Esta proteína asociada a los microtúbulos normalmente interactúa con la tubulina para estabilizar los microtúbulos. En la enfermedad de Alzheimer (EA) y de parkinson (PD) $A\beta$ causaría una activación de p38 MAPK en la célula que conduce a la fosforilación anormal de Tau. ¹² Este último induce la acumulación como filamentos helicoidales emparejados que se agregan dentro de las neuronas en ovillos neurofibrilares, lo que hace que los microtúbulos sean inestables y causen la pérdida de la funcionalidad de las neuronas.²

1.2.1. Péptido β amiloide ($A\beta$)

EL péptido β Amiloide ($A\beta$) está formado por una secuencia de 38 a 43 aminoácidos. La forma más común de $A\beta$ en humanos es de 40 aminoácidos de largo y se llama $A\beta_{40}$. Un fragmento de 42 aminoácidos

de longitud, A β 42, es menos abundante que A β 40 y solo difiere en que tiene 2 residuos de aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal. El fragmento A β 42 está asociado con (EA). Éste péptido se genera por la acción de enzimas proteolíticas llamadas secretasas de tipo β y γ que actúan sobre una molécula precursora llamada APP.²

En primer lugar, α -secretasa (escisión "normal" no neurotóxica) o β -secretasa (posible escisión "anormal" neurotóxica) escinde APP, y una segunda escisión del producto β -secretasa, por γ -secretasa, escinde APP más para producir A β . Dependiendo del punto de corte por la γ -secretasa, se producen 2 formas principales de A β que consisten en 40 o 42 residuos de aminoácidos (A β 40 o A β 42) (Figura N° 1). La proporción de A β 40 a A β 42 que se forma es particularmente importante en (EA) porque A β 42 es mucho más propenso a oligomerizarse y formar fibrillas que el péptido A β 40 producido más abundantemente.^{13,14}

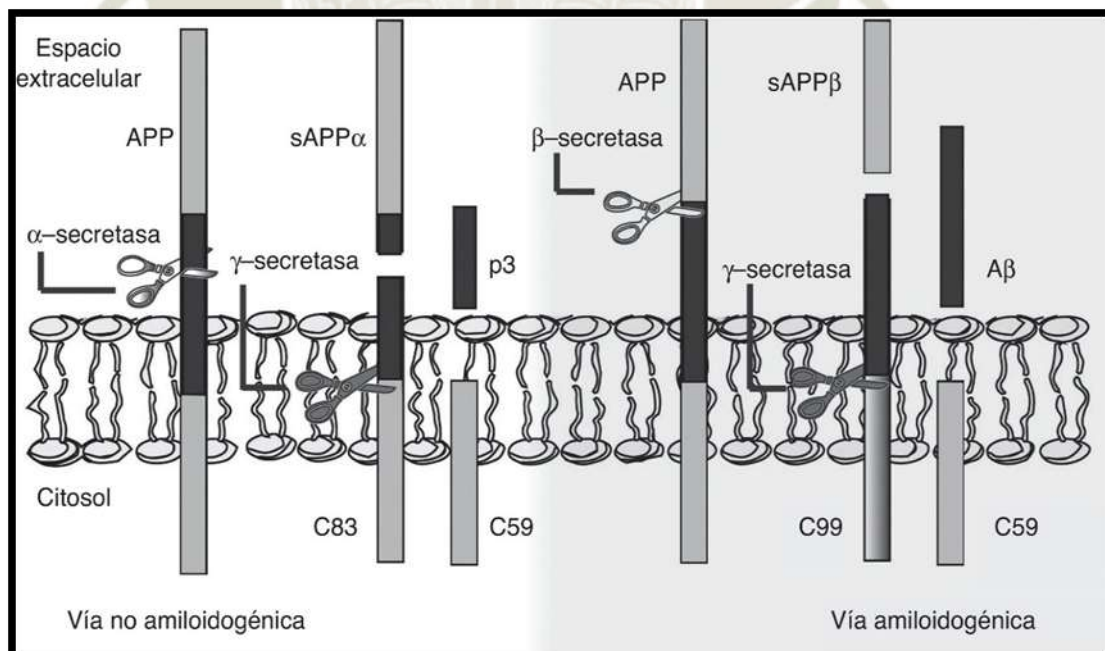


FIGURA N° 1 Mecanismo de formación del péptido β amiloide ⁹

1.2.2. Genética de la Enfermedad.

Si bien esta enfermedad se presenta en mayor porcentaje en adultos mayores, existen estudios que relacionan la presencia de ciertos genes con esta enfermedad. El gen que se ha encontrado constantemente asociado con personas que manifiestan la enfermedad, es el gen de la apolipoproteína E (APOE)^{15,16}. Además, se han informado variantes genéticas no replicadas, y estos hallazgos sugieren que puede haber 5 a 7 genes de susceptibilidad a cambios que producen tal patología.⁸

Se ha descubierto mutaciones en los genes Presenilina 1 (PSEN1) y Presenilina 2 (PSEN2) que son dos subunidades de γ -secretasa), desencadenantes de EA temprana (Figura N° 2. Las mutaciones tanto en *PSEN1* como en *PSEN2* conducen a una mayor producción de A β , las mutaciones de *PSEN1* conducen específicamente a un aumento de la formación de A β ₄₂.⁸ Las mutaciones se dividen en tres categorías: mutaciones en el sitio de escisión de β -secretasa (término N), en el sitio de escisión de γ -secretasa (término C) y en la región β de amiloide de dominio medio.¹⁷ Las mutaciones en el sitio de corte de la γ -secretasa pueden alterar la posición de escisión y conducir a un aumento de la relación $A\beta_{42} / A\beta_{1-40}$. Las mutaciones en el sitio de escisión de β -secretasa aumentan la tasa de proteólisis de APP por la β -secretasa. Las mutaciones en el dominio medio de la región A β en APP altera el ensamblaje de A β al aumentar la propensión de A β a formar oligómeros y fibrillas.¹⁸

1.2.3. Síntomas, signos y Diagnóstico

La enfermedad de Alzheimer comparte características clínicas con otro tipo de demencias. Clínicamente la enfermedad se presenta en diferentes etapas de acuerdo a manifestaciones cognitivas conductuales y la afeción de las actividades de la vida diaria. En personas con antecedentes genéticos puede detectarse la enfermedad con biomarcadores a partir de sangre o líquido cefaloraquídeo, si bien no

presentan síntomas propios de la enfermedad, presentan algunos trastornos como ansiedad depresión e irritabilidad.¹⁹

Clasificación genotípica de los diferentes tipos de enfermedad de Alzheimer					
Tipo	Nomenclatura	Cromosoma	Locus	Gen	Fenotipo
I	EA-I	21	21q21	APP	EAP/F Autosómica dominante
II	EA-II	19	19cen-q13.2	APOE	EAT/E Polimórfica
III	EA-III	14	14q24.3	Presenilina-1	EAP/F Autosómica dominante
IV	EA-IV	1	1q31-q32	Presenilina-2	EAF Autosómica dominante
V	EA-V	12	12p11.23- q13.12	AD5	EAT Polimórfica
VI	EA-VI	12	12p13.3-p12.3	A2M	EAT Polimórfica
VII	EA-VII	17	17q11.2	BMH	EAT Polimórfica
VIII	EA-VIII	17	17q23	ACE1	EAT/Vasc/HTA Polimórfica
IX	EA-IX	17	17q21.1	TAU	EA/DFT Tauopática
X	EA-X	Varios	Varios	Varios	EA(mut)
XI	EA-XI	Varios	Varios	Varios	EA(sus)
XII	EA-XII	Mitocondrial	COI/COII	COI/COII	EA Heteroplásmica

DFT: Demencia frontotemporal
 EAE: Enfermedad de Alzheimer esporádica
 EAF: Enfermedad de Alzheimer familiar
 EAP: Enfermedad de Alzheimer precoz
 EAT: Enfermedad de Alzheimer tardía
 Mut: Mutacional
 Sus: Susceptibilidad

(Adaptado de Cacabelos, 1999)

Figura N° 2 : Clasificación genotípica de los diferentes tipos de enfermedad de Alzheimer.⁵

La pérdida de la memoria a corto plazo suele ser el primer signo aparecer en la enfermedad en la etapa prodrómica o predemencia de alzheimer, que no afectan las actividades instrumentales de la vida diaria y son insuficientes para el diagnóstico de demencia y en la cual se detecta la presencia de marcadores biológicos en LCR o neuroimágenes que apoyan la sospecha de cambios patológicos compatibles con EA.²⁰ En Etapas más avanzadas de la enfermedad los síntomas cognitivos (memoria episódica y por lo menos otro dominio cognitivo) son lo suficientemente severos como para interferir con el funcionamiento social y las actividades instrumentales de la vida diaria.

1.2.4. Pronóstico y Tratamiento

Los fármacos elegidos para este tipo de demencia son los inhibidores de la colinesterasa que mejoran modestamente las funciones cognitivas y la memoria de algunos pacientes. El donepecilo constituye el fármaco de primera línea porque su administración se realiza una vez al día y es bien tolerada.^{20,21}

El antagonista del receptor N-metil-D- aspartato memantina , parece frenar la progresión de la enfermedad.^{20,21}

2. ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)

Los procesos oxidativos biológicos normales, se realizan para generar energía bajo la forma de ATP. Al consumir un alimento, este tendrá que ser oxidado, esto quiere decir que un par de electrones serán transferidos a una serie de intermediados hasta el aceptor final que es el oxígeno y como producto se obtendrá una molécula de agua.

En este proceso normal el oxígeno acepta cuatro electrones y cuatro protones para producir dos moléculas de agua. Pero si se produce una reacción parcial del O_2 pueden generarse diferentes aniones tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}). Conocidos como especies reactivas de oxígeno (EROs) (figura N°3).

Las especies reactivas de oxígeno se caracterizan por presentar pares de electrones desapareados que serán donados para generar una molécula estable. Son compuestos potencialmente peligrosos porque son muy reactivos y, por lo tanto, difíciles de controlar (como HO^{\cdot}), o son precursores que fácilmente forman especies muy reactivas e incontrolables (como $O_2^{\cdot -} + NO \rightarrow$ peroxinitrito).²

Los EROs son subproductos fisiológicos inevitables que actúan como un arma de doble filo en el sistema biológico pueden cumplir funciones cruciales, como señalar moléculas en situaciones cuidadosamente controladas, pero pueden dañar el sistema biológico cuando están presentes en exceso, ya que son capaces de oxidar todas las biomoléculas principales, incluidos los ácidos nucleicos (ADN, ARN), proteínas y lípidos.

22

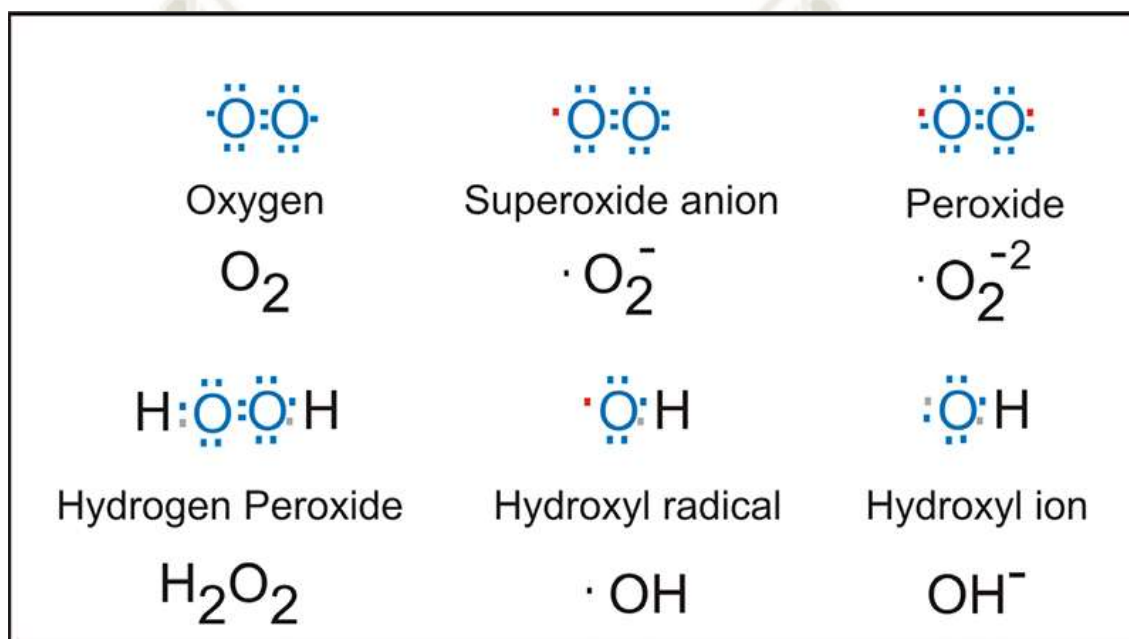


Figura N° 3 Estructuras electrónicas de especies de oxígeno reactivas comunes. Cada estructura cuenta con su nombre y fórmula química. El rojo • designa un electrón desapareado.⁴⁴

Las especies reactivas de oxígeno pueden formar radicales libres a partir de diversos mecanismos, siendo la adición de un electrón a una molécula estable el más común.²³ Una vez que estos son formados, buscan el modo de conseguir una configuración electrónica estable, razón por la cual interactúan con otras moléculas a través de reacciones de óxido reducción (redox). En dichas circunstancias, hay una transferencia de electrones que necesariamente implican la reducción (ganancia de electrones) y oxidación (pérdida de electrones) de las moléculas participantes. Dicho mecanismo genera que la producción de radicales libres sea una reacción en cadena, ya que al reaccionar un radical libre con una molécula no radical inevitablemente esta

última pasa a ser un RL. Dicha reacción en cadena solamente se detendrá cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí.^{24,25}

La acumulación de niveles demasiado altos de EROS es peligrosa y se define como estrés oxidativo. La acumulación de EROs puede ocurrir ya sea por una sobreproducción o por una eliminación insuficiente de EROs.²

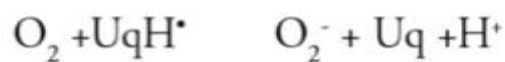
2.1. Principales especies reactivas de oxígeno

2.1.1. Anión superóxido (O_2^-)

Es el radical más abundante y común a nivel celular. Se forma principalmente en la cadena de transporte de electrones y en la fagocitosis para ser usado como defensa bactericida.^{27,28} Es generado en reacciones de autooxidación y enzimáticas en diferentes organelos celulares²⁶

a) *Mitocondrias.-*

- Por la oxidación de la semiquinona de la ubiquinona



- Por la oxidación de la semiquinona de la flavina de la NADH deshidrogenasa



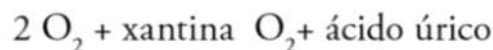
b) *Retículo endoplásmico.*

- A través del citocromo P450 y de la flavoproteína NADPH – citocromo P450 reductasa:



c) Citosol.

- Por acción de la enzima xantina oxidasa



Dentro de las sustancias que se oxidan y permiten la generación de esta forma reactiva se encuentran; la hemoglobina, mioglobina y catecolaminas. De igual forma, enzimas como xantina oxidasa y NADPH oxidasa generan radicales superóxido. También, dentro de la fagocitosis es producido superóxido gracias a la activación de la enzima NADPH oxidasa que se encuentra en la membrana celular.²⁶

2.1.2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)²⁶

Esta molécula no se considera un radical libre, pero puede formar el radical hidroxilo cuando se encuentra en presencia de metales como el hierro. Se forma principalmente en la matriz mitocondrial, al realizar la reducción parcial de oxígeno o en la dismutación del radical superóxido por la enzima superóxido dismutasa (SOD).²⁹

EL peróxido de hidrógeno se forma en distintas organelas celulares como: el retículo endoplásmico, peroxisomas y citosol, a través de las siguientes reacciones:

a) Mitocondria.

A partir de la dismutación del O₂⁻, catalizada por la superóxido dismutasa.



b) Retículo endoplásmico.

Por la autooxidación del citocromo P450 (FMNH₂) de la citocromo c NADPH reductasa

**c) Peroxisomas.**

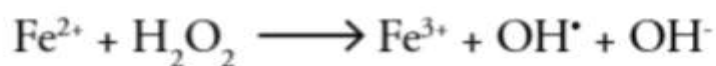
En este organelo se encuentran diferentes proteínas que pueden dar origen al H₂ O₂ como lo son: la urato oxidasa, la 1- α -hidroxiácido oxidasa y la D-aminoácido oxidasa.³⁰ Además, algunos microorganismos como bacterias y micoplasmas liberan peróxido de hidrógeno, el cual por su capacidad de atravesar membranas biológicas puede causar daño en el huésped a nivel celular.²⁶

2.1.3. Radical Hidroxilo (OH[·])

Este radical presenta un tiempo de vida corta pero tiene una alta reactividad. El daño producido es mayor en comparación a las otras especies reactivas de oxígeno, debido a que las células no cuentan con un sistema enzimático antioxidante contra este radical.³¹ La formación de este radical a nivel celular se da por varios mecanismos, dentro de los cuales se encuentra; la radiolisis del agua que contiene la célula cuando esta es expuesta a radiaciones ionizantes como los rayos X y los rayos gamma. Además, al reaccionar el radical superóxido con el peróxido de hidrógeno se produce el radical hidroxilo a través de la reacción Haber – Weiss.³¹



Por otro lado, la formación del radical hidroxilo, desde el peróxido de hidrógeno, puede llegar a ser catalizada por la presencia de iones de metales de transición como lo muestra la reacción de Fenton.²⁶



La principal organela generadora de las especies reactivas de oxígeno es la mitocondria ya que estas moléculas se forman en los pasos intermedarios para la reducción del oxígeno en agua.

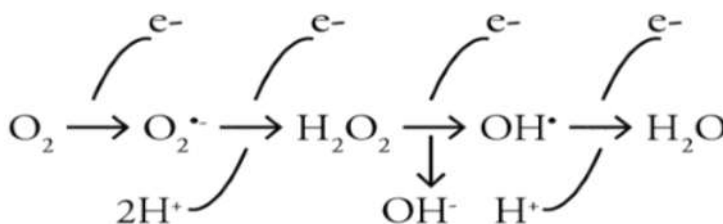


Figura N°4 Mecanismo de formación de las especies reactivas de oxígeno.⁴⁴

3. RELACION DEL ESTRÉS OXIDATIVO CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

Las especies reactivas de oxígeno como se habían mencionado antes se generan en el metabolismo normal que sufre el oxígeno, en condiciones normales sus valores se encuentran bajos gracias al equilibrio existente entre la tasa de producción y tasa de eliminación por medio de

antioxidantes y enzimas relacionadas. Por lo tanto, la producción de EROS aumentada o el sistema antioxidante deteriorado inclinarán el equilibrio redox celular al desequilibrio oxidativo y causarán sobreproducción de (EROS).²²

Las moléculas que se oxidan en la EA principalmente son biomoléculas de la membrana neuronal. Como lípidos (entre ellos, el colesterol), proteínas y ácidos nucleicos como consecuencia se ve alterada la integridad de la membrana y la funcionalidad de las proteínas.

El estrés oxidativo ocurre temprano en el curso de la EA, lo que apoyaría su papel en la patogénesis de la EA, en relación con la presencia de A β . De hecho se ha informado que niveles elevados de péptido β amiloide se asocian con mayores niveles de producción de oxidación a partir de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en el hipocampo y la corteza AD.³²

3.1. Peroxidación de lípidos.-

La peroxidación lipídica se refiere al proceso en el que los EROS son atacados por lípidos a través de un mecanismo de reacción en cadena de radicales libres para generar productos de peroxidación lipídica.³² Los ácidos grasos polisaturados altamente oxidable como los ácidos araquidónico y docosohexanoico están presentes en el cerebro.³³ Los productos de peroxidación de lípidos más extensos estudiados en EA son los aldehídos reactivos que incluyen 4-hidroxinona, malondialdehído (MDA), 2-propenal (acroleína), y isoperostanoides químicamente y metabólicamente estables que incluyen F2-isopEROstano y F4-neuroperostanos (Figura N° 5).

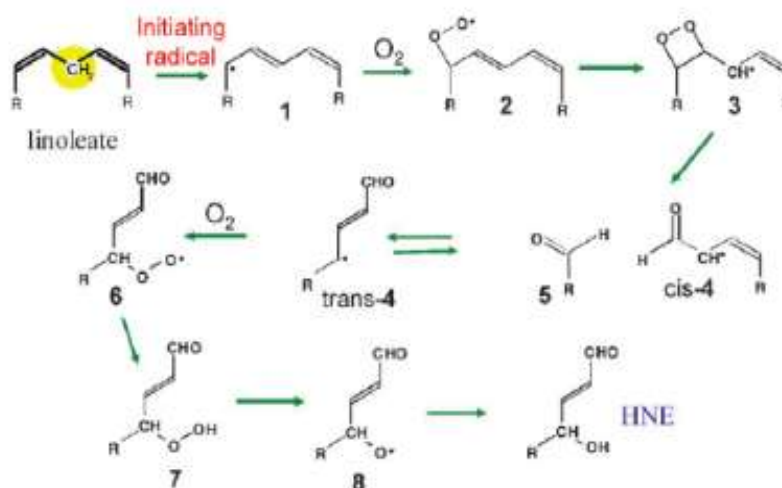


FIGURA N° 5 Mecanismo de formación de peroxidación lipídica. ²⁴

3.2. Oxidación de proteínas

En personas que desarrollan la EA se ha detectado un aumento significativo del nivel de carbonilo de proteínas específicas tales como creatina quinasa, glutamina sintasa y ubiquitina carboxilo terminal hidrolasa L-1 en diferentes regiones del cerebro con AD, incluyendo hipocampo, lóbulos frontal y temporal, lóbulo parietal inferior y cerebelo. ³⁴ También se ha detectado una modificación oxidativa, a 3-nitrotirosina, resultante de la interacción de peroxinitrito con residuos de tirosina y se encontró que aumentó significativamente en AD en diversas regiones del cerebro. ³⁵

3.3. Oxidación del ADN y ARN

El daño oxidativo del ADN puede causar roturas de doble cadena de ADN, reticulación de ADN / ADN o ADN / proteína y modificación de la base. Se encontraron altos niveles de rupturas de ADN tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral. ^{22,36}

Los marcadores oxidativos de ADN más utilizados en la EA son 8-hidroxidodeguinasina (8-OHdG) y 8-hidroxiguanosina (8-OHG), que es el producto de la oxidación de guanina. La guanina es la base más atacada

por el estrés oxidativo debido a su bajo potencial de oxidación en comparación con las otras tres bases de ADN. Los cerebros EA demostraron un aumento significativo de 8OHdG y 8-OHG tanto en el ADN mitocondrial como en el ADN nuclear en comparación con los controles de la misma edad.^{37,38,39}

El estrés oxidativo podría estar involucrado también en la eliminación de A β . Por lo tanto, se ha formulado la hipótesis de que A β oxidaría LRP1, lo que llevaría a la acumulación del péptido neurotóxico A β en el cerebro.^{40,41}

3.4. Sistema de defensa para las especies reactivas de oxígeno

Los antioxidantes son moléculas a que retarda o previene la oxidación de un sustrato oxidable, que puede ser; lípido, proteína, DNA, o cualquier otro tipo de molécula ⁴² desarrollado por los organismos superiores como mecanismos de defensa, estos pueden ser de tipo enzimático o no enzimático

El componente de tipo enzimático se considera como la primera línea de defensa primaria, y se encarga de evitar el acúmulo de EEROS como; el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, catalizando la transferencia de electrones de un sustrato hacia los RL.⁴³

Dentro del sistema de defensa antioxidante enzimático se encuentran las siguientes enzimas:

- Superóxido Dismutasa (SOD). - Esta enzima posee como función catalizar la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno que luego será degradado por enzimas como catalasa o glutatión peroxisada.^{42,43}

Catalasa. Es una hemoproteína que se concentra principalmente en los peroxisomas y en las mitocondrias, se encarga de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno,

- Glutación peroxidasa (GPx). Es una selenoproteína, en presencia de GSH, como agente reductor, cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos en agua y alcohol, respectivamente

Los antioxidantes de tipo no enzimáticos son un conjunto de moléculas tanto hidrófobas como hidrofílicas que tienen como función; capturar RL y generar moléculas menos nocivas para la célula, mediante la adición de un electrón al RL con el objetivo de estabilizarlo.^{26,75}

Dentro del sistema de defensa antioxidante no enzimático se encuentra:

- **Vitamina C.** Se encuentra a nivel intra y extracelular en la forma de ascorbato, actúa directamente sobre los radicales superóxido, hidroxilo y algunos hidroperóxidos lipídicos, además de actuar sobre el tocoferoxilo, transformándolo a vitamina E. Sin embargo, el ascorbato puede llegar a ser un potente prooxidante cuando se encuentran presentes excesivas concentraciones de iones hierro y cobre.²⁶
- **Glutación.** Consiste en un tripéptido que presenta una distribución tisular variable y es considerado el compuesto tiólico de bajo peso molecular, de mayor abundancia en las células de los mamíferos. Actúa sobre el peróxido de hidrógeno, superóxido y el radical hidroxilo.²⁶
- **Flavonoidespolifenólicos.** Dentro de los flavonoidespolifenólicos se encuentran un amplio grupo de compuestos fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas) que actúan como quelantes de metales y que además, capturan de forma in vitro ERO y ERN. Como la vitamina E,

la vitamina A, la ubiquinona (coenzima Q), la albúmina, el ácido lipoico, el fibrinógeno, la bilirrubina y la glucosa ²⁶

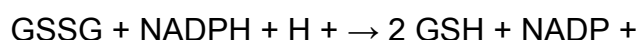
4. METODOS EMPLEADOS PARA MEDIR EL ESTRÉS OXIDATIVO

A nivel celular, los EROS específicos pueden evaluarse individualmente a partir del cultivo de tejidos, mientras que a nivel de los animales, por lo general, los efectos del estrés oxidativo se miden a partir de un producto sanguíneo (por ejemplo, suero o plasma) o de muestras de orina.⁴⁴

4.1. Determinación de Glutación

El glutación es el mecanismo de defensa oxidante no enzimático más importante. Existe en cantidades relativamente grandes (niveles de mM) y sirve para desintoxicar peróxidos y regenerar una serie de antioxidantes importantes (p. Ej., A-tocoferol y ácido ascórbico).⁴⁴

El glutación reducido (GSH) se regenera a partir de su forma oxidada (GSSG) mediante la acción de una reductasa dependiente de NADPH



Existen varios ensayos para medir el glutación en muestras. Al usar un derivado de luciferina junto con la enzima glutación S-transferasa, la cantidad de GSH sería proporcional a la señal luminiscente generada cuando se agrega luciferasa en un paso posterior.²⁵ El glutación total se puede determinar colorimétricamente haciendo reaccionar GSH con DTNB (reactivo de Ellman) en presencia de glutación reductasa. La glutación reductasa reduce GSSG a GSH, que luego reacciona con DTNB para producir un ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) de color amarillo, que absorbe a 412 nm.⁴⁴

4.2. Determinación de Peroxidación Lipídica

La peroxidación lipídica es uno de los indicadores más utilizados de formación de radicales libres, un indicador clave del estrés oxidativo.

Los ácidos grasos insaturados, que forman parte de las membranas celulares, son un objetivo común para los radicales libres, éstos capturan un resto de hidrógeno de un carbono insaturado para formar agua. Esto deja un electrón desapareado en el ácido graso que luego es capaz de capturar oxígeno, formando un radical peroxi (Figura 5). Los peróxidos lipídicos son inestables y se descomponen para formar una serie compleja de compuestos, que incluyen compuestos de carbonilo reactivos, como el malondialdehído (MDA). Estas reacciones ocurren en cadena.

El malondialdehído generado reacciona con el ácido barbitúrico en condiciones ácidas a 90-100 °C generando un aducto que puede medirse colorimétricamente a 532 nm o mediante fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 550 nm. La desventaja de este método es la inespecificidad del MDA ⁴⁵ (figura N°6)

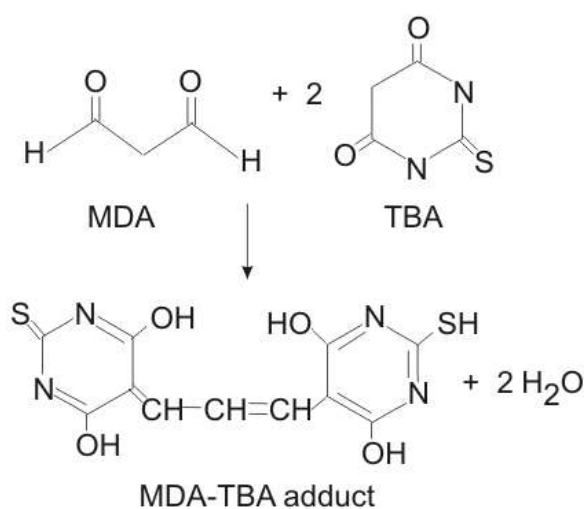


Figura N° 6 Determinación de malondialdehído con ácido barbitúrico ⁴⁴

4.3. Determinación de superóxido

La detección de superóxido se basa en la interacción de superóxido con algún otro compuesto para crear un resultado medible.

La producción celular de superóxido se puede visualizar mediante dihydroetidium, también denominado hidroetidina. Este compuesto exhibe una fluorescencia azul en el citosol hasta que se oxida principalmente por superóxido y en mucha menor medida por otras especies reactivas de oxígeno o nitrógeno reactivo.

La oxidación de dihydroetidium resulta por la hidroxilación en la posición 2 formando 2-hidroxietilo (Figura 9). Con la oxidación, el compuesto se intercala con el ADN celular, dejando al núcleo teñido de un rojo fluorescente brillante que puede ser detectada a longitudes de onda de emisión de 535 nm y transmisión 635 nm, respectivamente (Figura N°7).

46

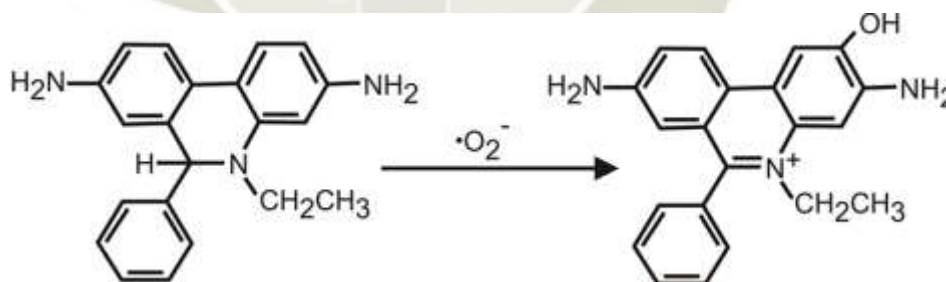


Figura N°7 : Determinación de anión superóxido con método de dihidroetidido ⁴⁴

El superóxido específico para las mitocondrias se puede visualizar usando microscopía de fluorescencia con reactivo MitoSOX™ Red (Life Technologies). El reactivo MitoSOX™ Red es un derivado catiónico de dihydroetidium que penetra las células vivas donde se dirige selectivamente a las mitocondrias. El sustituyente trifenilfosfonio catiónico del indicador rojo MitoSOX es responsable de la captación

electroforéticamente conducida de la sonda en las mitocondrias que respiran activamente.

Al igual que con el dihydroetidium, este compuesto se intercala con el ADN mitocondrial y produce fluorescencia roja. Mientras que las mediciones de fluorescencia se pueden realizar utilizando la longitud de onda de excitación pico de 510 nm con una detección de emisión a 590 nm.⁴⁴(FiguraN°8)

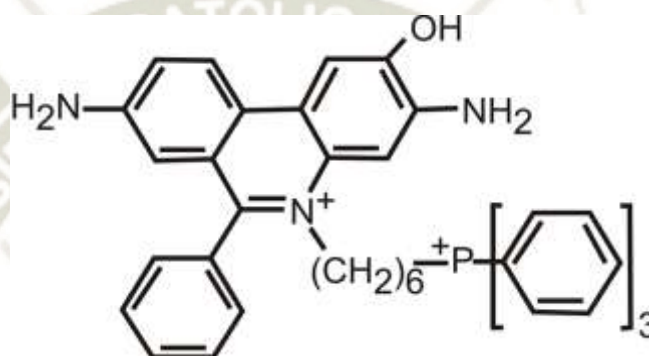


Figura N°8 Determinación de peróxido con MITOSOX ⁴⁴

4.4. Determinación de Peróxido de hidrógeno

Existen una serie de sustratos fluorogénicos que al combinarse con con el peróxido de hidrógeno generan productos intensamente fluorescentes Por ejemplo, Amplex Red se oxida con peróxido de hidrógeno en presencia de HRP (peroxidasa) y al hacerlo se convierte en resorufina compuesto que puede ser detectado colorimétricamente a 570 nm o mediante fluorescencia utilizando una excitación de 570 nm y una emisión de 585 nm.^{44,47}

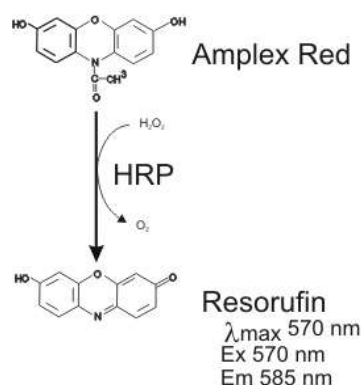


Figura N° 9 : Determinación de Peróxido de hidrógeno con resorufina ⁴⁴

Otro método muy utilizado para la cuantificación del peróxido de hidrógeno es el que utiliza como sustrato al reactivo 2,7-Diclorodihidrofluorescein diacetate (DCFHDA) de composición apolar y tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática. Una vez dentro es hidrolizada por la esterasas de la célula a diclorofluorescina (DCFH) que en presencia de H_2O_2 , se convierte en su forma fluorescente (DCF), que es altamente fluorescente. La medición de la fluorescencia de DCF se realiza a 498 nm para la excitación y 522 nm para la emisión.⁴⁴

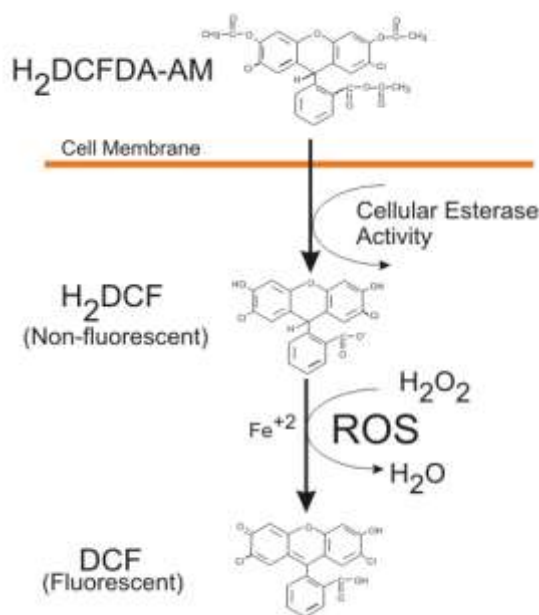


Figura N° 10: Determinación de Peróxido de hidrógeno con al reactivo 2,7-Diclorodihidrofluorescein diacetate (DCFHDA)⁴⁴

5. CULTIVO CELULAR

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.^{48,49.}

El cultivo celular fue originado como una herramienta de investigación celular, poseen diversas ventajas sobre los organismos intactos. Primero la mayoría de los tejidos animales y vegetales se componen de diversos tipos de células, mientras que utilizando el cultivo celular se puede cultivar células de un único tipo específico con propiedades homogéneas. Segundo, las condiciones experimentales pueden controlarse mejor en un cultivo que en un organismo intacto. Tercero, en muchos casos una única célula puede ser cultivada más rápidamente hasta formar una colonia de muchas células idénticas.⁵⁰

Una desventaja importante de las células cultivadas es que no se encuentran en su ambiente normal y por ende sus actividades no están reguladas por otras células y tejidos como ocurre en un organismo intacto. Como también la distribución de las células y la matriz extracelular alrededor de una célula influye en su forma y comportamiento.⁵⁰

Para la proliferación de las células es necesario mantenerlas en ambientes adecuados como incubadoras reguladas a 37°C con una atmosfera de 5 % de CO₂,; además debe proporcionarse un medio de cultivo con los nutrientes necesarios para el crecimiento y diferenciación celular .

La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo. Cuando se mantiene el cultivo se establece una nueva selección: aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. En el momento en que se alcanza la confluencia las células, en general, detienen su crecimiento, aunque pueden

existir tipos celulares, neoplásicos, que sigan duplicándose y que desplacen a los otros del cultivo.⁴⁹

5.1. Cultivo primario.

Cultivo establecido a partir de un tejido u órgano. Las células mantienen la viabilidad un periodo de tiempo limitado y no se reproducen en cultivo. En general en cultivo presentan una reducción en el número total de células vivas a lo largo del tiempo. Ejemplos: hepatocitos obtenidos de hígado adulto, neuronas, etc.⁴⁹

5.2. Línea primaria

Cultivo establecido a partir de un tejido u órgano que se mantiene un periodo de tiempo limitado pero con reproducción de las células en el cultivo. Ejemplos: fibroblastos dérmicos, queratinocitos, células endoteliales de aorta bovina (BAEC), células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC), etc.⁴⁹

5.3. Línea celular continua.

Cultivo que se establece a partir de un tejido u órgano, en muchos casos de un tumor, y que se mantiene en cultivo un tiempo ilimitado. Se trata de células “inmortales”.

5.4. Células de neuroblastoma SH-SY5Y

El uso de células de neuroblastoma de humano SH-SY5Y entre otros tipos de células, han permitido el diseño de métodos eficaces para la investigación de drogas y la consecuente identificación de agentes que pudiesen causar variaciones en el número y componentes celulares como neurotransmisores, presencia de especies reactivas de oxígeno etc.⁵¹

La línea de células SH-SY5Y es una sublínea tres veces clonada de las células SK-N-SH que se establecieron inicialmente a partir de una biopsia de médula ósea de un paciente con neuroblastoma origen ganglionar simpático adrenérgico a principios los años 70.⁵⁰

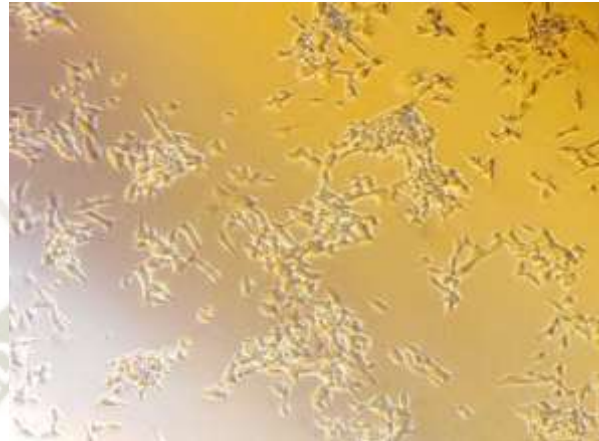


Figura N° 11 : Células de neuroblastoma humano SH-SY5Y

Células SH-SY5Y se derivaron de células de la cresta neural inmaduros neoplásicas que exhiben propiedades de las células madre y las células SH-SY5Y son inducidas a diferenciarse tras el tratamiento con una variedad de agentes, incluyendo ácido retinoico, forbol éster 12-O tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), cerebro-factor neurotrófico derivado (BDNF), dibutilil AMP cíclico (AMPcdb), purina, en consecuencia, la línea celular SH-SY5Y ha sido ampliamente utilizado en neurológica experimental estudios, incluido el análisis de la diferenciación neuronal, metabolismo y función relacionada con procesos neurodegenerativos y neuroadaptativos, neurotoxicidad, y neuroprotección.⁵⁰

5.5. Medio de Cultivo

El cultivo celular se realiza en medios artificiales preparados mediante la mezcla de componentes purificados o de soluciones orgánicas complejas, en el interior de instrumentos que mantienen las condiciones físico-químicas adecuadas y sobre soportes o recipientes que los contienen y aíslan del medio exterior.⁵⁰

Para mantener estas células se deben cultivar en Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés Dulbecco's modified eagle médium), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés Fetal Bovine Serum) (v/v) y una solución de penicilina-estreptomicina al 1% (v/v). Siendo incubadas a 37°C en una atmosfera húmeda con 5% de CO₂.⁵¹ . Pueden ser sembradas entre aproximadamente 1000 a 1000000 células por pozo en platos de 96 pozos, y crecer hasta un 75-80% de confluencia por pozo. En este estado, las células, pueden ser expuestas a diferentes tipos de agentes nocivos para imitar los mecanismos de acción de lesiones que se cree, ocurren in vivo.

Entre estos agentes nocivos se encuentra, el peróxido de hidrógeno que permite imitar los efectos del estrés oxidativo que se produce en las células.

6. LEPIDIUM MEYENII L. (MACA)

Lepidium meyenii, conocida en América del Sur como "Maca", es un cultivo andino, que se encuentra solo en un área muy restringida del centro del Perú, en la zona agroecológica entre 4000 y 4500 m. Existen tres variedades de Maca, reconocibles por el color característico externo de los hipocotilos o raíces como son : la Maca Negra, Maca Amarilla y Maca Roja).^{52,53}

Se cree que esta antigua planta cultivada por nativos desde la época de los Incas tiene efectos favorables sobre la energía y el estado de ánimo, la fertilidad, el deseo sexual y la disminución de la ansiedad. Varios estudios mostraron que los diferentes colores de la maca producen diferentes respuestas biológicas. La maca roja por ejemplo revierte la hiperplasia benigna prostática inducida por testosterona ⁵⁵ y la osteoporosis inducida por ovariectomía en ratas adultas ⁵⁶, mientras que la maca negra induce al

aumento de espermatozoides y reduce los niveles de azúcar en la sangre,
⁵⁷ además de mejorar la memoria y aprendizaje.⁵⁸



Figura N°12 Hipocotilos de Maca Roja, Negra y Amarilla ⁵⁴

**TABLA N° 1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Lepidium meyenii* L
(MACA).⁵¹**

REINO	Vegetal
DIVISION	Fanerógamas
SUBDIVISION	Angiospermas
CLASE	Dicotiledóneas
ORDEN	Archiclamideas
FAMILIA	Rhoedales
GÉNERO	Brassicaceae
ESPECIE	<i>Lepidium</i>
VARIEDAD	<i>Lepidium meyenii</i> L. <i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp.
NOMBRE COMÚN	Maca , Maca maca , Ayak chichita, Maka, Maino, Huto-huto, Ginseng peruano, Viagra peruano, Ayak, willku, pepper weed, power root and herbal viagra

6.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

La maca presenta metabolitos primarios y secundarios. Un estudio demostró la cantidad de metabolitos primarios presentes en los hipocotilos secos de *Lepidium meyenii* L. donde afirman el contenido de 10.2 % de proteínas, 59% de carbohidratos, 2.2% de lípidos y 8.5% de fibra.⁵¹

TABLA N° 2 : COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *Lepidium meyenii* L (MACA)⁶⁰

Componentes	Contenido (%)
Proteínas	8,87 – 11,60
Lípidos	1,09 – 2,20
Carbohidratos	54,60 – 60,00
Fibra	8,23 – 9,08
Cenizas	4,90 – 5,00

Además presenta una cantidad elevada de ácidos grasos insaturados (57.7%) y saturados (40.1%) siendo los de mayor porcentaje el ácido linoleico y ácido palmítico respectivamente.^{51,59}

En la raíz de maca existen 18 o 19 aminoácidos, resaltando que 7 de ellos son esenciales. Los minerales encontrados por 100 g de materia seca de maca que destacan son: calcio 247 mg, fósforo 183 mg y hierro 14,7 mg.⁶⁰

6.1.1. METABOLITOS SECUNDARIOS

Los metabolitos secundarios encontrados en las raíces de la maca y que se atribuyen propiedades farmacológicas a la maca son: los macaenos y macamidas, glucosinolatos, alcaloides, ésteres de ácidos grasos y fitoesteroles.

A) Macaenos y Macamidas

Estos metabolitos solo están presentes en las raíces de las maca por lo que se les considera marcadores químicos. Los macaenos son ácidos grasos insaturados, y las macamidas o alquilamidas son derivados lipídicos formados por la unión de aminas y ácidos grasos. La composición porcentual de macaeno en una muestra de maca seca varía ente 0,09% hasta 0,45%, y macamidas de 0,06% a 0,52%.⁶⁰

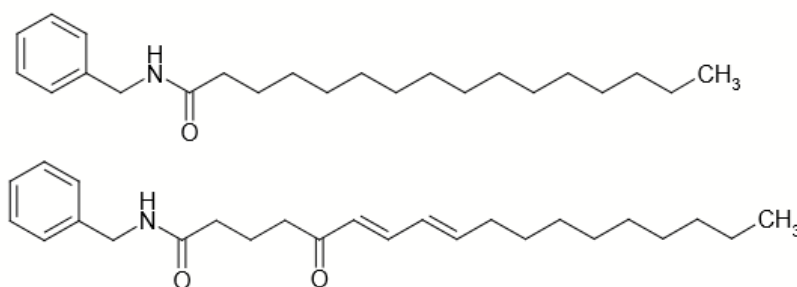


Figura N°13: Macamidas Sintéticas⁵¹

Las macamidas son muy parecidas estructuralmente a sustancias del sistema endocanabinoide, por lo que se ha probado efectos farmacológicos relacionados con este sistema, como la capacidad de inhibir la FAAH (Fatty Acids Amide Hydrolase, por sus siglas en inglés) enzima encargada de la degradación de anandamida (endocanabinoide) hasta convertirlo en ácido araquidónico y etanolamina. Es importante mencionar que los inhibidores de FAAH poseen efectos farmacológicos como analgesia, anti inflamatorio y neuroprotector.^{51,63}

B) Glucosinolatos

Estos heterosidos sulfocianogénicos son los responsables del sabor picante de la maca. El principal glucosinolato es un compuesto benzilado (glucotropaeolin) y su derivado metoxi

(metoxiglucotropaeolin), que han presentado efectos anticancerígenos y antimicrobianos.

Estudios realizados por Li et al. (2001) informa que la composición porcentual de glucosinolatos en maca fresca es alrededor de 1 %, que a comparación de cultivos de crucíferas (col y coliflor)

C) Alcaloides

Se han encontrado alrededor de 60 tipos diferentes de alcaloides de acuerdo con sus estructuras básicas. Estudios realizados han aislado tres tipos de alcaloides provenientes de las raíces de maca, de los cuales: dos alcaloides imidazólicos (A y B) lepidiline y un derivado bencilado de 1,2-dihidro-Nhidroxipiridina, llamado macaridina.^{60,62}

D) Esteroles

Se han informado más de 200 tipos diferentes de esteroles, entre ellos β -sitosterol, campesterol y estigmasterol como los más abundantes. Los beneficios reportados de los esteroles de la maca son: como reductor de colesterol en plasma, previene problemas menopáusicos, y mejora las posibilidades de fertilidad, también tiene propiedades antiinflamatorias y antioxidantes.

6.2. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA MACA

a) Acción antioxidante

Los antioxidantes ayudan a neutralizar los radicales libres (causantes del cáncer, enfermedades cardiovasculares y la diabetes) presentes

en la sangre, actuando como captadores de oxígeno y no mostrando efectos secundarios tóxicos. ^{60,62}

b) Efecto sobre la fertilidad

La maca presentan compuestos similares a la testosterona por esta razón puede presentar actividades biológicas similares a la testosterona. Diferentes estudios han demostrado un aumento de espermatozoides.^{55,57} Probablemente el beneficio de la maca sea gracias a la relación entre glucosinolatos y receptor de andrógenos.

c) Efectos sobre la menopausia

Desde tiempos antiguos se ha utilizado la maca para contrarrestar la anemia, problemas de infertilidad y desequilibrio hormonal en el organismo femenino. En un ensayo realizado, se determinó que los extractos etanólicos de maca, redujeron los efectos colaterales de la ovariectomía, esto se demostró en el aumento de la densidad mineral ósea de la columna lumbar de las ratas ovariectomizadas. ⁶⁰

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS.

1. MATERIALES.

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1.1. NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

En la presente investigación se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC®), donada por la Universidad *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University*, Boston, USA.

Las células donadas fueron cultivadas según el protocolo de cultivo celular mencionado más adelante, luego fueron almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido a -195° C hasta el momento de su utilización.

La muestra biológica se reconstituyó por incubación en medio de cultivo para células a condiciones adecuadas para su proliferación.

1.1.2. EXTRACTO PÉNTANICO DE *Lepidium meyenii* L (Maca).

Se utilizaron los extractos pentánicos de las tres variedades de maca como son la negra, amarilla y roja que se obtuvieron utilizando el método de extracción por Soxhlet y reextracción líquido-líquido .

1.2. MATERIALES Y REACTIVOS

1.2.1. Equipos utilizados.

- Cámara de flujo laminar de presión positiva
- Microscopio invertido
- Clitómetro de Flujo MUSE
- Centrifuga para tubos de centrifuga de 15 mL
- Centrifuga para tubos eppendordt

1.2.2. Reactivos

- Etanol
- Dimetil sulfoxido (DMSO)
- Péptido β amiloide (AB)
- N-benciloctadienildecenamida
- Peróxido de hidrógeno al 30 % (H_2O_2)
- Medio Dulbecco Modified Eagle (DMEM),
- Tripsina-EDTA, suero
- Fetal de bovino (FBS)
- Kits para determinar viabilidad de células
- Kits para determinar stress oxidativo
- Extracto pentanico de *Lepidium meyenii* L. obtenido por el grupo de investigación del laboratorio de Neurociencias y Biología Molecular , de la Universidad Católica de Santa María almacenado a $-80^\circ C$

1.2.3. Materiales descartables y de vidrio

- Tubos de centrifuga de 45 mL y 15 mL.
- Tubos de microcentrifuga (Eppendorf).
- Puntas desechables para micropipeta
- Micropipetas de 10, 20, 200, 1000 uL
- Frascos para cultivo celular de 5 y 15 mL
- Platos de incubación para crecimiento celular transparente de 96 pozos.

- Pipetas de 1, 5 y 10ml.
- Matraces de 100, 500 y 1000ml.
- Probetas de 500 y 1000ml.
- Vaso de precipitado de 50ml.
- Viales.

1.3. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.

La investigación se realizó en el laboratorio Neurociencias y Biología Molecular de la Universidad Católica de Santa María .

2. METODOLOGÍA

2.1. CULTIVO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron cultivadas en flack de 75 mL con medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) con 10% de suero fetal de bovino (FBS) e incubadas a una temperatura de 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂. Cuando estas llegaron a una confluencia de 80 a 90 % se realizó un segundo pasaje para cultivar las células en placas de 96 pozos a una concentración de 30 000 células por pozo.

2.1.1. PROCEDIMIENTO PARA GENERAR UN NUEVO PASAJE

- Desechar el medio de los flacks de incubación.
- Agregar 10 mL de Tripsina-EDTA a cada flack , y se agita ligeramente.
- Incubar a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ por 5 minutos.
- Para detener el efecto de la tripsina se agrega 10 mL de medio DMEM sin FBS mezclando.
- Transferir el contenido a tubos de 15 mL
- Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos.

- Eliminar el sobrenadante y quedarse con el precipitado
- Suspender el pellet o precipitado con medio completo y proceder a sembrar en flack ó placas de 96 pozos según corresponda, con medio completo
- Incubar a 37°C en una atmosfera de CO₂ al 5% hasta llegar a la confluencia deseada

2.1.2. PROCEDIMIENTO PARA EL CONTEO DE CÉLULAS VIABLES

a) Fundamento del método

Con este kits se puede tener con precisión los recuentos totales de células y la viabilidad, en función de las permeabilidades diferenciales de dos colorantes de unión al ADN. El tinte nuclear tiñe solo las células nucleadas, mientras que el tinte de viabilidad tiñe de manera brillante las células muertas. Esta combinación patentada de colorantes permite al kit distinguir las células viables y las muertas. Además, los residuos se excluyen de los resultados basados en la tinción negativa con el tinte nuclear.

En la Figura N° 14 - 1A se muestra los resultados obtenidos sin mostrar los gráficos de puntos, mientras que en la figura N° 14 -1B se muestran los resultados obtenidos con los gráficos de puntos opcionales que se muestran. Las estadísticas muestran las células viables / mL, el porcentaje de viabilidad y las células totales / mL (figura N° 14-1A). En el segundo gráfico (Figura N°14-1B) se muestra el gráfico de la Viabilidad frente a las células Nucleadas.

b) Procedimiento

- Desechar el medio de los flacks de incubación.
- Agregar 10 mL de Tripsina-EDTA a cada flack , y se agita ligeramente.

- Incubar a 37°C en una atmosfera de 5% de CO₂ por 5 minutos.
- Para detener el efecto de la tripsina se agrega 10 mL de medio DMEM sin FBS
- Transferir el contenido a tubos de 15 mL
- Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y quedarse con el precipitado
- Suspender el pellet o precipitado con 1 mL medio completo
- Tomar 20 uL de la suspensión de células preparadas y adicionar 380 mL del reactivo de identificación (figura N° 15)
- Con los datos obtenidos de la lectura de viabilidad, calcular la cantidad de células por pozo con la siguiente fórmula :

$$C^1 / 0.180 \times V^1 = C^2 \times V^2$$

Donde :

C¹ : Concentraciones de células deseadas por pozo

0.180 : Volumen en mL de cada pozo

V¹ : Volumen total de los pozos para un ensayo

C² : Concentración de células viables

V² : Volumen necesario de células viables

- EL volumen obtenido de células será diluido con medio completo para los ensayos según sea el caso



Figura N° 14 : Cuantificación de células viables utilizando el citometro de flujo

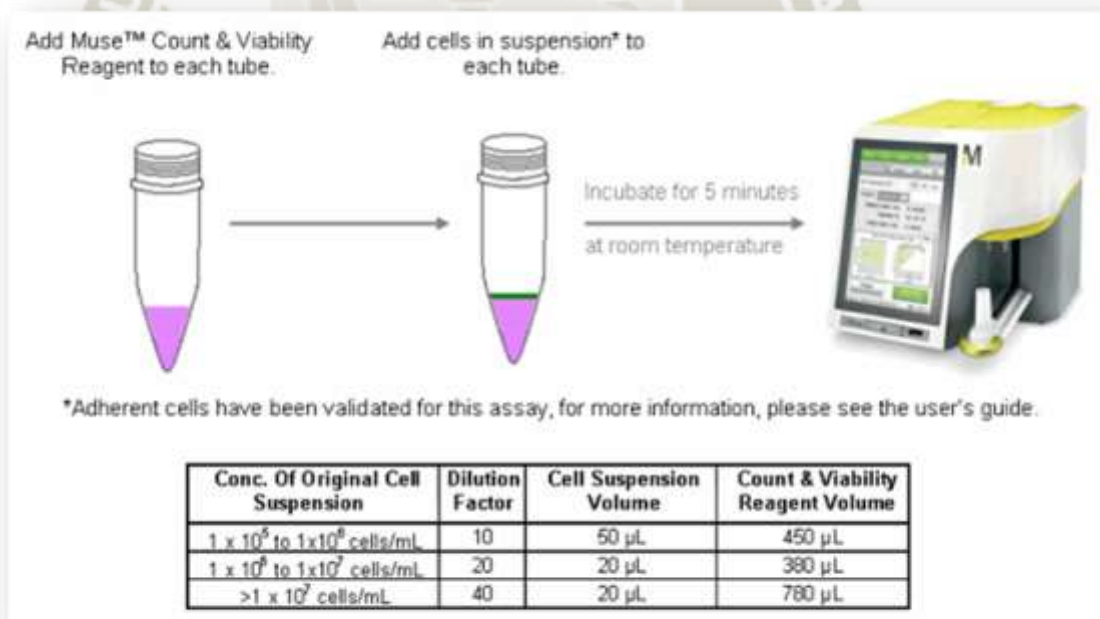


Figura N° 15 : Procedimiento para la cuantificación de células viables

2.2. ENSAYOS PARA DETERMINAR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS)

2.2.1. MÉTODO GENERAL PARA DETERMINAR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROS)

a) Fundamento del Método

El Kit utilizado para la determinación de especies reactivas de oxígeno tiene el compuesto Dihydroethidium (DHE), compuesto no fluorescente que puede atravesar la membrana de células. En el interior se oxida por el anión superóxido produciendo etidium, compuesto que se intercala en el DNA emitiendo fluorescencia.

En la figura N° 16 se observa en la parte superior la forma como se expresan los resultados en porcentaje de células que generan EROs positivo y EROs negativo, además del número total de células detectadas por mL, y en la parte inferior los gráficos respectivos

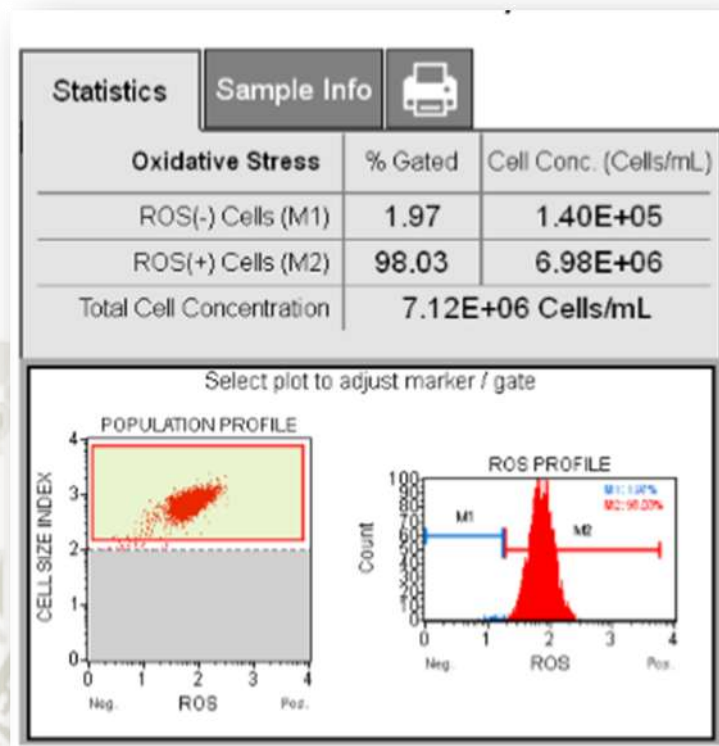


Figura N° 16: Determinación de las especies reactivas de oxígeno utilizando el citómetro de Flujo

b) Procedimiento

- Desechar el medio de cada pozo de la placa de 96 pozos
- Agregar 75 uL de Tripsina-EDTA a cada pozo , y agitar ligeramente.
- Incubar la placa a 37°C en una atmosfera de 5% de CO2 por 5 minutos.
- Para detener el efecto de la tripsina se agrega 150 uL de medio DMEM sin FBS
- Transferir el contenido a tubos eppendorf de 1 mL
- Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y quedarse con el precipitado
- Adicionar al precipitado 10 uL de medio y 190 uL del reactivo de identificación

- Leer en el cito metro de flujo después de 30 minutos de incubación (Anexo) (figura)

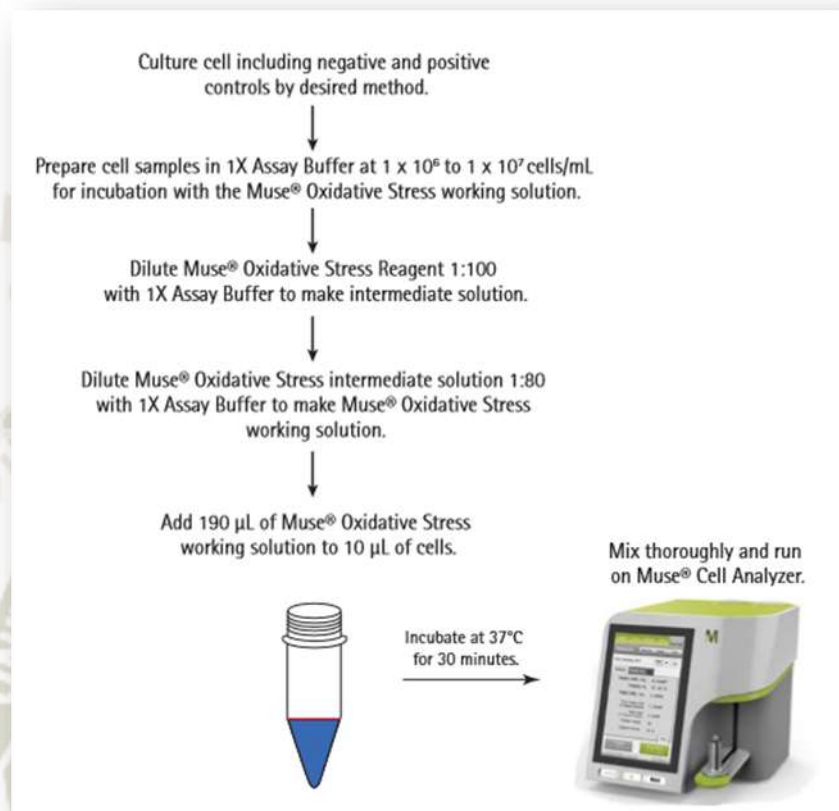


Figura N° 17 Procedimiento para la determinación de las especies reactivas de oxígeno (EROs)

2.2.2. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LAS DISTINTAS VARIEDADES DE *Lepidium meyenii* L. (Maca)

a) Preparación de las soluciones de los extractos pentánicos de *Lepidium meyenii* L. (Maca)

Para la preparación de la muestra se tomó como vehículo DMSO al 98 % y se pesó 10 mg del extracto pentánico, y se diluyó con un mL del vehículo para obtener una solución stock de 10 000 ppm. a partir de

esta solución se prepararon estándares de 100, 200, 2000, 5000 ppm diluidos con DMSO al 0.5 %

De cada estándar se tomó 10 uL y se completó con 1.99 mL de medio incompleto (medio con 5 % de suero fetal bovino) para tener a un volumen final de 2 mL. Las nuevas concentraciones fueron de 0.5; 1; 10; 25 y 50 ppm que fueron aplicadas a cada pozo de la placa de 96. El objetivo de agregar a cada solución 10 uL de cada estándar fue el de mantener la misma concentración de DMSO para que no influya en los valores de EROs determinados. Se trabajó de esta manera con las tres variedades de maca.

Además se preparó un tubo blanco con 10 uL de DMSO al 0.5 % y 1,99 mL de medio.

**TABLA N° 3 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE LOS
EXTRACTOS DE MACA**

Vol. de Sol. Stock (10000 ppm)	Vol. de DMSO al 0.5 %	Primera Concentración de Estándares (ppm)	Vol. de primera Concentración de estándares en ppm	Vol. de medio incompleto	Concentración de estándares por pozo en ppm
5 uL	495 uL	100	10 uL	1,99 mL	0.5
10 uL	490 uL	200	10 uL	1,99 mL	1
100 uL	400 uL	2000	10 uL	1,99 mL	10
250 uL	250 uL	5000	10 uL	1,99 mL	25
-	-	10000	10 uL	1,99 mL	50

Para realizar este ensayo se consideró una concentración de 30000 células / pozo, éstas se lograron obtener a partir del número aproximado de células del conteo celular.

Se preparó 1 placa por cada variedad de maca para determinar la producción de estrés oxidativo, que fue medido a las 24 horas debido a que las células estarán expuestas en este periodo de tiempo, antes de inducir el estrés oxidativo con el péptido β amiloide . Se utilizaron 6 columnas y se consideraron 6 filas de pozos por cada columna, preparando un total de 36 pozos por placa.

b) Procedimiento

EL primer día del ensayo las células fueron tratadas con medio completo, esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó suero fetal bovino al 10 % , luego fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el segundo día se retiró el medio completo y se adicionó medio incompleto esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó 5 % de suero fetal bovino, y fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el tercer día se aplicó el tratamiento con los extractos de la maca de la siguiente manera : a los pozos de la columna N°1 se adicionó medio incompleto , a los pozos de la columna N°2 se les adicionó extracto de maca en una concentración de 0.5 ppm , a los pozos de la columna N° 3 se les adicionó extracto de maca en una concentración de 1 ppm a los pozos de la columna N°4 se les adicionó extracto de maca en una concentración de 10 ppm , a los pozos de la columna N°5 se les adicionó extracto de maca en una concentración de 25 ppm y por último a los pozos de la columna N°6 a una concentración de extracto de maca 50 ppm respectivamente.

Estas concentraciones se utilizaron para cada variedad de maca es decir para la maca negra, roja y amarilla.

2.2.3. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LA N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA

a) Preparación de las soluciones de N-benciloctadienildecanamida

Para la preparación de las soluciones de la macamida sintética N-benciloctadienildecanamidase trabajó a partir de una solución stock de concentración 27.1 mM a partir de esta solución se preparó una solución de concentración 1000 uM y de esta solución se prepararon estándares de 10, 20, 100, 200 y 1000 uM diluidos con DMSO al 0,5 %

De cada estándar se tomó 17,5 uL y se completó con 3,483 mL de medio incompleto (medio con 5 % de suero fetal bovino) para tener a un volumen final de 4 mL. Las nuevas concentraciones fueron de 0.05 ; 0,1; 0,5; 1 y 10 uM que fueron aplicadas a cada pozo de la placa de 96. El objetivo de agregar a cada solución 17,5 uL de cada estándar fue el de mantener la misma concentración de DMSO para que no influya en los valores de EROs determinados.

Además se preparó un tubo blanco con 17,5 uL de DMSO al 0.5 % y 3,483 mL de medio.

TABLA N° 4 : PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE LA MACAMIDA SINTÉTICA N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA

Vol. de Sol. Stock (1000 uM)	Vol. de DMSO al 0.5 %	Primera Concentración de Estándares (uM)	Vol. de primera Concentración de estándares en ppm	Vol. de medio incompleto	Concentración de estándares por pozo en uM
5 uL	495 uL	10	17,5 uL	3,483 mL	0.05
10 uL	490 uL	20	17,5 uL	3,483 mL	0,1
50 uL	450 uL	100	17,5 uL	3,483 mL	0,5
100 uL	400 uL	200	17,5 uL	3,483 mL	1
17,5 uL	-	1000	17,5 uL	3,483 mL	10

b) Procedimiento

Para realizar este ensayo se consideró una concentración de 30000 células / pozo, éstas se lograron obtener a partir del número aproximado de células del conteo celular.

Para este ensayo se preparó una placa, cuya evaluación de estrés oxidativo, será medido a las 24 horas debido a que las células estarán expuestas en este periodo de tiempo. Se utilizaron 6 columnas y se consideraron 6 filas de pozos por cada columna, preparando un total de 36 pozos por placa.

EL primer día del ensayo las células fueron tratadas con medio completo, esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó suero fetal bovino al 10 % , luego fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el segundo día se retiró el medio completo y se adicionó medio incompleto esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó 5 % de suero fetal bovino, y fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el tercer día se aplicó el tratamiento con diferentes concentraciones de la macamida sintética elegida de la siguiente manera : a los pozos de la columna N°1 se adicionó medio incompleto , a los pozos de la columna N°2 se les adicionó macamida sintética en una concentración de 0.05 uM, a los pozos de la columna N° 3 se les adicionó macamida sintética en una concentración de 0.1 uM a los pozos de la columna N°4 se les adicionó macamida sintética en una concentración de 0,5 uM , a los pozos de la columna N°5 se les adicionó macamida sintética 1 uM y por último a los pozos de la columna N°6 a una concentración de 10 uM respectivamente.

2.2.4. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO PRODUCIDO POR EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

a) Preparación de las soluciones de Peróxido de Hidrógeno

El peróxido de hidrógeno se preparó a partir de una solución stock al 30 %, obteniendo 2 mL de una solución a concentración de 9800 mM, el vehículo utilizado para la dilución fue agua estéril.

De la solución stock se tomaron 50 uL y se diluyó con medio incompleto (medio con 5 % de suero fetal bovino) para obtener un volumen final de 2 mL , la concentración de esta segunda dilución fue de 6125 uM (solución 2)

De la solución dos se tomaron volúmenes distintos para obtener concentraciones de 25, 50 y 100 uM por pozo utilizando como vehículo el medio incompleto (medio con 5 % de suero fetal bovino) .

Tabla N° 5

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Vol. de Solución de H ₂ O ₂ (6125 uM)	Vol. de medio incompleto	Concentración de estándares H ₂ O ₂ de por pozo en uM
8 uL	1992 uL	25
16 uL	1984 uL	50
32 uL	1968 uL	100

b) Procedimiento

Para realizar este ensayo se consideró una concentración de 30000 células / pozo, éstas se lograron obtener a partir del número aproximado de células del conteo celular.

Se prepararon 3 placas para determinar la producción de estrés oxidativo que fue medido a los 30 min, una hora y 2 horas con el kits de estrés oxidativo. En cada placa se utilizaron 4 columnas y se consideraron 6 filas de pozos por cada columna, preparando un total de 24 pozos por placa.

El primer día del ensayo la células fueron tratadas con medio completo , esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó suero fetal bovino al 10 % , luego fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas , el segundo día se retiró el medio completo y se adicionó medio incompleto esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó 5 % de suero fetal bovino, y fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el tercer día se aplicó el tratamiento con peróxido de hidrógeno de la siguiente manera : a los pozos de la columna N°1 se adicionó medio incompleto , a los pozos de la columna N°2 se les adicionó peróxido de hidrógeno en concentración 25 uM , a los pozos de la columna N° 3 se les adicionó peróxido de hidrógeno en concentración 50 uM a los pozos de la columna N°4 se les adicionó peróxido de hidrógeno 100 uM respectivamente. .

Pasado los primeros 30 minutos se leyó el estrés oxidativo de la primera placa, a la hora de la segunda placa y a las 2 horas la tercera placa.

2.2.5. DETERMINACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO PRODUCIDO POR EL PEPTIDO β AMILOIDE

a) Preparación de las soluciones del péptido β amiloide

El péptido se preparó a partir de una solución stock al 1000 uM, que se preparó pesando 1 mg que se diluyó con DMSO como vehículo para obtener un volumen final de 1 mL

De la solución stock se tomó 40 uL y se diluyó con 3,96 mL de medio para obtener una concentración de 10 uM, a partir de esta solución se tomaron diferentes volúmenes para obtener concentraciones de 0.1; 0.5; 1; 5; y 10 uM del péptido por pozo, se preparó 2,5 mL de cada concentración.

TABLA N° 6 : PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DEL PÉPTIDO β AMILOIDE

Vol. de Solución de péptido AB amiloide (10 uM)	Vol. de medio incompleto	Concentración del péptido β amiloide por pozo en uM
25 uL	2475 uL	0.1
125 uL	2375 uL	0.5
250 uL	2250 uL	1
1250 uL	1250 uL	5
2500 uL	-	10

b) Procedimiento

Para realizar este ensayo se consideró una concentración de 30000 células / pozo, éstas se lograron obtener a partir del número aproximado de células del conteo celular.

Se prepararon 3 placas para determinar la producción de estrés oxidativo que fueron medidos a los 30 min, una hora y 2 horas con el kits de estrés oxidativo.

En cada placa se utilizaron 6 columnas y se consideraron 6 filas de pozos por cada columna, preparando un total de 36 pozos por placa.

El primer día del ensayo la células fueron tratadas con medio completo, esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó suero fetal bovino al 10 % , luego fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas , el segundo día se retiró el medio completo y se adicionó medio incompleto

esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó 5 % de suero fetal bovino, y fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el tercer día se aplicó el tratamiento con el péptido β amiloide de la siguiente manera : a los pozos de la columna N°1 se adicionó medio incompleto , a los pozos de la columna N°2 se les adicionó péptido beta amiloide en concentración 0.1 uM , a los pozos de la columna N°3 se les adicionó péptido beta amiloide en concentración 0.5 uM a los pozos de la columna N°4 se les adicionó péptido beta amiloide en concentración 1 uM , a los pozos de la quinta columna se les adicionó beta amiloide en concentración 5 uM, por último a los pozos de la columna N° 6 se les adicionó beta amiloide en concentración 10 uM.

Pasado los primeros 30 minutos se leyó el estrés oxidativo de la primera placa, a la hora de la segunda placa y a las 2 horas la tercera placa

2.2.6. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LAS TRES VARIEDADES DE *Lepidium meyenii* L. (Maca) Y AL PÉPTIDO β AMILOIDE

Para realizar este ensayo se consideró una concentración de 30000 células / pozo, esta concentración se logró obtener a partir del número aproximado de células del conteo celular.

EL primer día del ensayo la células fueron tratadas con medio completo , esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó suero fetal bovino al 10 % , luego fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas , el segundo día se retiró el medio completo y se adicionó medio incompleto esto quiere decir que al medio utilizado se le adicionó 5 % de suero fetal bovino, y fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el tercer día se aplicaron los siguientes tratamientos que se describen a continuación : a los pozos de la columna N°1 se adicionó medio incompleto , a los pozos de las columnas N°2 y N°3 se les adicionó DMSO al 0.5 % solo, por último a los pozos de las columnas N°4 , N°5

y N° 6 se les adicionó maca a diferentes concentraciones de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores .

Después de 24 horas de tratamiento las células fueron expuestas al péptido β amiloide a la concentración que generó mayor estrés oxidativo y la lectura se realizó en el tiempo en el que se produjo mayor estrés oxidativo.

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de cada muestra se utilizó la prueba estadística de un factor ANOVA seguido por el test de Tukey , El análisis de varianza ANOVA es el indicado para poder evaluar si hay o no diferencia significativa entre dos o varios grupos. Y el test de Tukey se realizó para comparar las variaciones entre los grupos a un nivel de significancia de 95 % (P 0.05) .

CAPÍTULO III

II. RESULTADOS Y DISCUSION

1. CULTIVO DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

Schubert et al en el año 1974 estableció los factores que pueden influir en el crecimiento y la diferenciación celular así como las características bioquímicas de la línea celular de neuroblastoma humano SH-Sy5y.⁶⁴

Las células de neuroblastoma humano SH-Sy5y originalmente fueron derivadas de un tumor oseo metastasico , y la ventaja de utilizarlas radica en que pueden propagarse fácilmente a condiciones preestablecidas a diferencia de neuronas primarias de mamíferos por el hecho de que una vez que se diferencian en neuronas maduras, las células ya no pueden propagarse.

Las poblaciones de neuroblastoma generadas por pasajes jóvenes tienen un tiempo de duplicación mayor que el de los pasajes derivados de los iniciales , y el tiempo de saturación del crecimiento celular es cuando éstas llegan a una concentración de 1×10^6 cel/mL

Los medios de cultivo proporcionaron las cantidades y nutrientes necesarios para que las células puedan propagarse, esto se evidencia con la rápida confluencia lograda (80 a 90 %) para realizar el ensayo figura N° 18 en un tiempo de 3 a 7 días y la presencia de las estructuras propias de las neuronas como son las dendritas y axones.

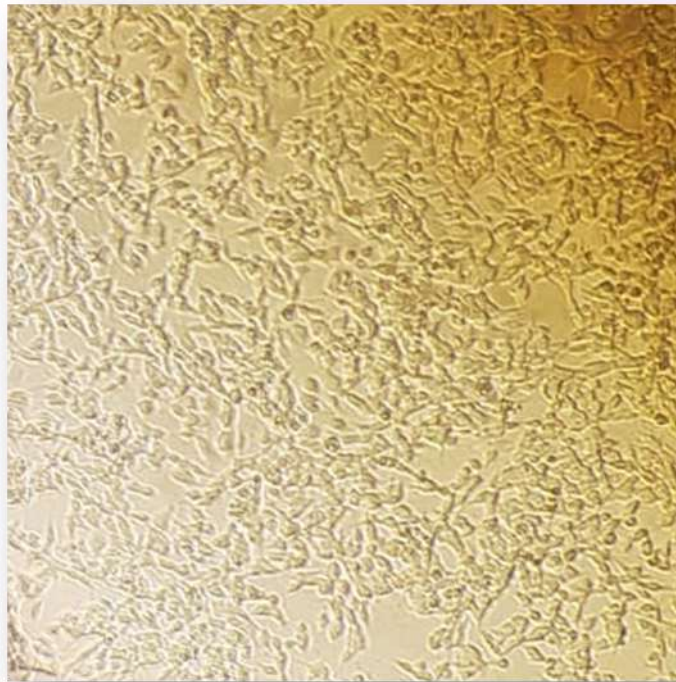


Figura N° 18 Células de Neuroblastoma humano SH-SY5Y a una confluencia de 80 %

- 2. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LAS DISTINTAS VARIEDADES DE MACA Y MACAMIDA SINTETICA N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA**
- A) EVALUACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO A DISTINTAS CONCENTRACIONES DE LA MACA Y MACAMIDA SINTETICA N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA**

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron expuestas a 5 concentraciones distintas del extracto pentánico para cada maca, el porcentaje de EROs generado en las células fue medido después de 24 horas de exposición al extracto, de la misma forma se trabajó con la macamida sintética N-benciloctadienildecanamida

En la tabla N°7 se muestra los promedios del porcentaje de EROS de los grupos control y de los grupos correspondientes a cada concentración de

maca, se observa que las concentraciones menores a 25 ppm no producen un aumento considerable de EROs en relación a los controles.

Los métodos de cuantificación más conocidos para medir la presencia de especies reactivas de oxígeno como anión superóxido y peróxido de hidrógeno se basan en la medición de la fluorescencia emitida por compuestos intercalantes del DNA, la oxidación de dihidroetidio resulta por la hidroxilación en la posición 2 formando 2-hidroxi-etilo, con esta oxidación, se forma un compuesto que se intercala con el ADN celular, dejando al núcleo teñido de un rojo fluorescente brillante que puede ser detectada a longitudes de onda de emisión de 535 nm y transmisión 635 nm, respectivamente. Este método y el método de cuantificación de peróxido de hidrógeno con el reactivo 2,7-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFHDA) son utilizados en la gran mayoría de trabajos para medir la formación de especies reactivas de oxígeno directamente (22)(44), por lo tanto los porcentajes de especies reactivas de oxígeno no son muy elevadas a diferencia de los métodos de cuantificación donde se evalúa la viabilidad celular (50).

Un estado de estrés oxidativo generado por las especies reactivas de oxígeno (EROs) , induce en la célula efectos tóxicos por oxidación de lípidos, proteínas, carbohidratos y nucleótidos.

TABLA N° 7 : PORCENTAJE DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO A 24 HORAS DE EXPOSICIÓN CON LAS DISTINTAS VARIEDADES DE MACA

Grupos	Porcentaje de Especies Reactivas de Oxígeno		
	Maca Negra	Maca Roja	Maca Amarilla
Control	2.7	2.6	2.2
0.5 ppm	1.8	1.2	1.9
1 ppm	1.7	2.0	2.2
10 ppm	1.8	2.8	2.8
25 ppm	1.8	2.5	2.7
50 ppm	2.5	4.5	4.7

En los estudios realizados por Gonzales et al 2005 e Yllescas et al 1994 describen la presencia de metabolitos secundarios como: alcaloides, esteroides, saponinas y glucósidos cardíacos y de macamidas y macaenos componentes presentes únicamente en la maca. Al trabajar con un extracto pentánico solo se aislará los componentes de naturaleza apolar, como esteroides, macamidas y macaenos. Estos entonces podrán ser los responsables de proveer protección citotóxica a las células en condiciones de estrés oxidativo (Ruijters et. al., 2013).

En la tabla N°8 se observa que la maca roja, amarilla y en la macamida sintética N-benciloctadienildecanamida presentan diferencias significativas en cuanto a la producción de EROs a distintas concentraciones. Los valores de EROs en la maca negra no mostraron una diferencia significativa con respecto al control, razón por la cual se puede decir que la exposición a este tipo de maca a concentraciones menores de 50 ppm del extracto administrado, presentan un mejor efecto protector frente a la producción de EROs cuando se aplica sola por un tiempo de exposición de 24 horas a un nivel de significancia de 0.05.

El porcentaje de EROs presente en las células expuestas a la macávida sintética N-benciloctadienildecenamida fue superior en todas las concentraciones en relación al grupo control probablemente el extracto pentánico este separando componentes de naturaleza apolar adicionales a las macamidas que puedan presentar efectos antioxidantes..

TABLA N° 8: ANOVA PARA LA EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DENTRO DE UN MISMO GRUPO

Variable Dependiente		N	Media	Desviación estándar	F	Sig.
Maca Negra	Control	3	2.74	0.47	2.68	0.08
	0.5 ppm	3	1.83	0.34		
	1 ppm	3	1.74	0.43		
	10 ppm	3	1.84	0.7		
	25 ppm	3	1.83	0.43		
	50 ppm	3	2.5	0.16		
Maca Roja	Control	3	2.6	0.06	7.37	0
	0.5 ppm	3	1.16	0.27		
	1 ppm	3	2	0.94		
	10 ppm	3	2.84	0.5		
	25 ppm	3	2.3	0.62		
	50 ppm	3	3.8	0.93		
Maca Amarilla	Control	3	2.2	0.94	13.67	0
	0.5 ppm	3	1.87	0.47		
	1 ppm	3	2.17	0.32		
	10 ppm	3	2.83	0.03		
	25 ppm	3	2.66	0.2		
	50 ppm	3	4.7	0.36		
N-benciloctadienildecenamida	Control	3	1.94	0.08	8.03	0
	0.5 ppm	3	2.91	0.55		
	1 ppm	3	3.6	0.36		
	10 ppm	3	2.86	0.27		
	25 ppm	3	2.74	0.29		
	50 ppm	3	2.64	0.23		

En el análisis posterior de comparaciones múltiples se encontró que existen una diferencia significativa entre la concentración de 0.5 ppm con el control, y de la concentración de 50 ppm con las concentraciones de 0.5 ppm y 1 ppm en la maca roja. Los valores encontrados de EROs en las células expuestas a concentraciones menores a 25 ppm son más bajas que el control por lo que puede considerarse que la maca roja disminuye la producción de EROs. En cuanto a la maca amarilla existe una diferencia significativa entre la concentración de 50 ppm con el control y las concentraciones más bajas (Tabla N°9)

TABLA N° 9: ANÁLISIS DE COMPARACIONES MÚLTIPLES ENTRE CONCENTRACIONES DEL MISMO GRUPO

Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Maca Roja	Control	0.5 ppm	2,44000*	0.52	0.01	0.68	4.20
	0.5 ppm	50 ppm	-2,64333*	0.52	0.00	-4.40	-0.89
	1 ppm	50 ppm	-1,80333*	0.52	0.04	-3.56	-0.05
Maca Amarilla	Control	50 ppm	-2,50000*	0.39	0.00	-3.81	-1.19
	0.5 ppm	50 ppm	-2,83000*	0.39	0.00	-4.14	-1.52
	1 ppm	50 ppm	-2,53333*	0.39	0.00	-3.85	-1.22
	10 ppm	50 ppm	-1,87000*	0.39	0.00	-3.18	-0.56
	25 ppm	50 ppm	-2,04000*	0.39	0.00	-3.35	-0.73
N-benciloctadienil decanamida	Control	0.05 uM	-,97000*	0.27	0.03	-1.86	-0.08
		0.1 uM	-1,66000*	0.27	0.00	-2.55	-0.77
		0.5 uM	-,91667*	0.27	0.04	-1.81	-0.02
	0.1 uM	10 uM	,96333*	0.27	0.03	0.07	1.86

Las concentraciones utilizadas para la macamida sintética N-benciloctadienildecanamida fueron las siguientes: 0.01; 0.05; 0,1; 0,5; 1 y 10 uM, en tabla N° 9 se encontró que existe una diferencia significativa entre todos los valores y el control debido a que los valores de EROs fueron mayores comparadas con el control

B) EVALUACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO COMPARANDO LAS DISTINTAS VARIEDADES DE MACA Y MACAMIDA SINTETICA N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA

En la tabla N° 10 se muestra que existe una diferencia significativa entre los tres tipos de maca y macamida sintética N-benciloctadienildecanamida las concentraciones de 0.5; 1 y 50 ppm, además al realizar el análisis entre grupos se observó una diferencia entre los grupos de maca roja, amarilla y negra a concentración de 50 ppm, de esta manera se demuestra que el efecto esperado depende del tipo de maca empleada.

Gonzales et al (2016) evaluó la composición de algunos metabolitos secundarios en los ecotipos negro y rojo y encontró que la maca negra presenta valores altos de macamidas y ácidos grasos polinsaturados por esta razón los porcentajes de EROs de maca negra fueron menores que los de maca roja y amarilla a una concentración de 50 ppm.

**Tabla N° 10 ANOVA PARA COMPARACION DE LAS VARIEDADES
DE MACA**

Variable Dependiente		N	Media	Desviación estándar	F	Sig.
0.5 ppm	Maca Negra	3	1.83	0.34	8.9	0.01
	Maca Roja	3	1.16	0.27		
	Maca Amarilla	3	1.87	0.47		
	B-benciloctadienildecanamida	3	2.91	0.55		
1 ppm	Maca Negra	3	1.74	0.43	6.46	0.02
	Maca Roja	3	2.00	0.94		
	Maca Amarilla	3	2.17	0.32		
	B-benciloctadienildecanamida	3	3.60	0.36		
50 ppm	Maca Negra	3	2.50	0.16	58.25	0.00
	Maca Roja	3	4.47	0.27		
	Maca Amarilla	3	4.70	0.36		
	B-benciloctadienildecanamida	3	2.64	0.23		

3. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO PRODUCIDO POR EL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

El término especies reactivas hace referencia a dos tipos de moléculas: los radicales libres y los no radicales. Este conjunto de moléculas se forma como resultado del metabolismo celular y se encuentran representados dentro de los sistemas biológicos por las especies reactivas de oxígeno formadas en procesos fisiológicos normales y procesos patológicos

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) no es un radical libre, pero es una forma reactiva de gran importancia, ya que posee la capacidad de generar el radical hidroxilo cuando se encuentra en presencia de metales como el hierro. EL peróxido de hidrógeno a nivel celular puede generar radical hidroxilo al reaccionar con el anión superóxido a través de la reacción de Haber – Weiss, por esta razón se considera al H_2O_2 como uno de los principales agentes causantes de generar EROs.

a) EVALUACION DEL TIEMPO DE EXPOSICION AL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

TABLA N° 11 ANOVA PARA PORCENTAJE DE EROs EN CÉLULAS EXPUESTAS PERÓXIDO DE HIDRÓGENO EN DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO

Variable Dependiente		N	Media	Desviación estándar	F	Sig
25 μ M	30 Min	3	2.67	0.25	22.03	0.00
	1 Hora	3	5.3	0.67		
	2 Horas	3	3.57	0.47		
50 μ M	30 Min	3	3.05	0.85	16.36	0.00
	1 Hora	3	6.2	0.61		
	2 Horas	3	4.29	0.55		
100 μ M	30 Min	3	4.16	0.19	75.95	0.00
	1 Hora	3	11.05	0.73		
	2 Horas	3	6.42	0.95		

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron expuestas a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno como se muestra en la tabla N°11, y se evaluó el porcentaje de especies reactivas de oxígeno (EROs) en función a la cantidad de anión superóxido presente, en intervalos de tiempo de 30 minutos, 1 hora y 2 horas.

Se observa que existe una diferencia significativa del porcentaje de EROs en los periodos de tiempo evaluados para cada concentración, mediante la prueba de Anova un nivel de significancia de 0.05.

TABLA N° 12 ANALISIS DE COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA PERIODOS DE EXPOSICION AL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
25 uM	30 Min	1 Hora	-2,62667*	0.40	0.00	-3.86	-1.39
		2 Horas	-0.9	0.40	0.14	-2.13	0.33
	1 Hora	2 Horas	1,72667*	0.40	0.01	0.49	2.96
50 uM	30 Min	1 Hora	-3,15333*	0.56	0.00	-4.86	-1.45
		2 Horas	-1.24	0.56	0.14	-2.95	0.46
	1 Hora	2 Horas	1,91000*	0.56	0.03	0.21	3.61
100 uM	30 Min	1 Hora	-6,88333*	0.57	0.00	-8.63	-5.14
		2 Horas	-2,25667*	0.57	0.02	-4.00	-0.51
	1 Hora	2 Horas	4,62667*	0.57	0.00	2.88	6.37

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

El análisis de datos de comparaciones múltiples mostrado en la tabla N° 12 en los que se evalúa el tiempo de exposición al peróxido de hidrógeno demuestra que existe una diferencia significativa cuando el tiempo de exposición es de una hora en comparación a los 30 minutos y 2 horas, para el método empleado de cuantificación de EROs, en cada concentración escogida debido a que presenta mayores porcentajes de EROs.

EL método utilizado para determinar EROs se basa en la medición de la fluorescencia de un agente intercalante. La Fluorescencia es un fenómeno físico mediante el cual ciertas sustancias absorben energía en forma de

radiación electromagnética emitiéndola en una longitud de onda mayor. Una de las desventajas de utilizar métodos de fluorescencia es que la medición debe realizarse en un tiempo muy corto por ser un compuesto inestable. Razón por la cual el porcentaje de Eros a las dos horas no haya disminuido de manera significativa, además de la inestabilidad inherente del peróxido de hidrógeno.

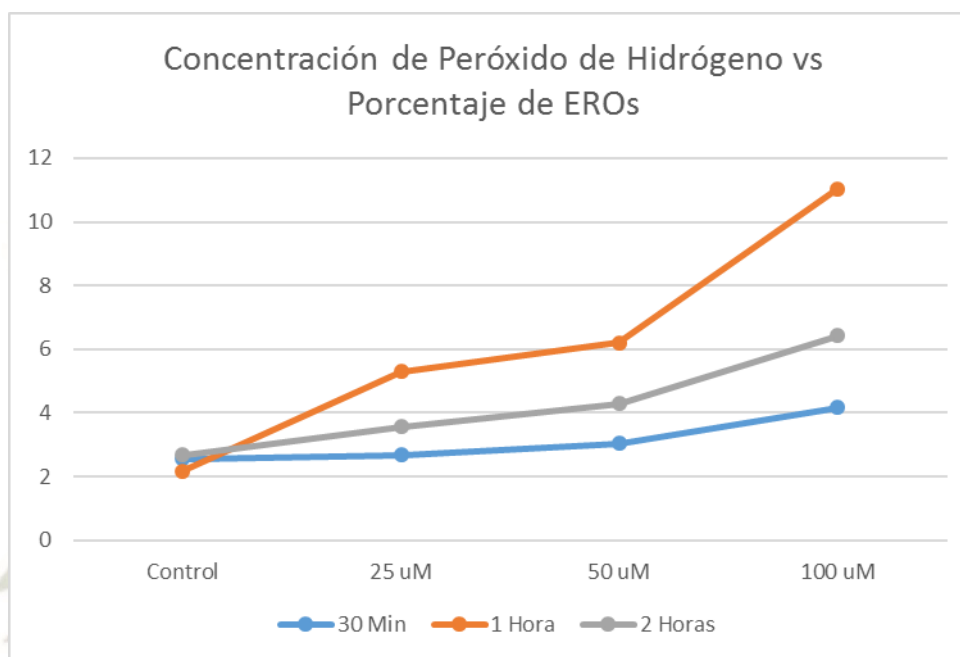


Figura N° 19 : EROs producido por peróxido de hidrógeno en diferentes periodos de exposición

b) EVALUACION DE LA CONCENTRACION DE PERÓXIDO DE HIDRÓGENO

Se consideraron concentraciones bajas de peróxido de hidrógeno como se muestran en la tabla N° 13 en relación a otros trabajos de exposición (Bautista et al 2013). La razón de emplear estas concentraciones fue de simular la concentración de peróxido de hidrógeno más real que se produce en condiciones fisiológicas normales dentro de la célula producto de los procesos de desintoxicación, además de poder comparar las especies reactivas de oxígeno producto del peróxido de hidrógeno, con las especies reactivas de oxígeno producto del péptido β amiloide donde se emplea concentraciones menores a 10 uM por referencias bibliográfica

**Tabla N° 13: ANOVA PARA LAS CONCENTRACIONES DE PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO**

Variable Dependiente		N	Media	Desviación estándar	F	Sig.
30 Min	Control	3	2.56	0.47	6.21	0.02
	25 uM	3	2.67	0.25		
	50 uM	3	3.05	0.85		
	100 uM	3	4.16	0.19		
1 Hora	Control	3	2.17	0.92	74.06	0.00
	25 uM	3	5.3	0.67		
	50 uM	3	6.2	0.61		
	100 uM	3	11.05	0.73		
2 Hora	Control	3	2.68	0.28	20.32	0.00
	25 uM	3	3.57	0.47		
	50 uM	3	4.29	0.55		
	100 uM	3	6.42	0.95		

En la tabla N° 14 se observa que existe diferencia significativa entre las concentraciones de peróxido de hidrógeno y el grupo control en los tres intervalos de tiempo escogidos. Es decir que el efecto producido en las células con peróxido de hidrogeno es directamente proporcional a las concentraciones elegidas

**TABLA N° 14 COMPARACIÓN DE CONCENTRACIONES DE PERÓXIDO DE
HIDRÓGENO EN CADA PERIODO DE EXPOSICIÓN**

Variable Dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
30 min	Control	25 uM	-0.12	0.42	0.99	-1.45	1.21
		50 uM	-0.49	0.42	0.65	-1.82	0.84
		100 uM	-1,60667*	0.42	0.02	-2.94	-0.28
1 Hora	Control	25 uM	-3,13000*	0.60	0.00	-5.06	-1.20
		50 uM	-4,03333*	0.60	0.00	-5.97	-2.10
		100 uM	-8,87667*	0.60	0.00	-10.81	-6.94
2 Horas	Control	25 uM	-0.89	0.50	0.35	-2.50	0.71
		50 uM	-1,61333*	0.50	0.05	-3.22	-0.01
		100 uM	-3,74000*	0.50	0.00	-5.34	-2.14

EL análisis posterior de comparaciones múltiples, en el que se evalúa la diferencia entre grupos a concentraciones distintas demuestra que a los 30 minutos de exposición no hay una diferencia significativa entre las concentraciones empleadas y el control, esto puede deberse a que el periodo de exposición es corto para poder cuantificar el EROs generado según el método escogido. Contrario a los resultados mostrados a la hora donde existe una diferencia significativa entre el control y todas las concentraciones escogidas.

En los tres periodos de tiempo escogidos se observó que los porcentajes de EROs más altos se obtuvieron cuando la concentración de peróxido de hidrógeno fue de 100 μ M.

4. DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO PRODUCIDO POR EL PEPTIDO β AMILOIDE

a) EVALUACION DEL TIEMPO DE EXPOSICION AL PEPTIDO β AMILOIDE

En esta prueba se evaluó si el tiempo de exposición al péptido β amiloide influye en la producción de EROs, por lo que se midió el porcentaje de EROs en intervalos de 30 min 1 H Y 2 H, las concentraciones empleadas de péptido se escogieron en función a trabajos de investigación en los que se utilizan concentraciones menores a 50 μ M (Slad Larid et al 2014). Se observó que existe una diferencia significativa entre los periodos de tiempo para cada concentración, y de estos se escogió el tiempo de exposición de 1 hora debido a que presentó mayor porcentaje de EROs significativo

**TABLA N° 15 ANOVA DEL PORCENTAJE DE EROs EN CÉLULAS
EXPUESTAS EN DIFERENTES PERIODOS DE TIEMPO AL PEPTIDO β
AMILOIDE**

Variable Dependiente		N	Media	Desviación estándar	F	Sig.
Control	30 Min	3	2.83	0.18	5.47	0.04
	1 Hora	3	2.78	0.21		
	2 horas	3	3.39	0.34		
0.1 μ M	30 Min	3	4.67	0.27	7.25	0.03
	1 Hora	3	4.97	0.26		
	2 horas	3	5.56	0.34		
1 μ M	30 Min	3	8.03	0.48	8.78	0.02
	1 Hora	3	8.09	0.29		
	2 horas	3	6.78	0.5		
5 μ M	30 Min	3	3.76	0.23	93.91	0.00
	1 Hora	3	6.54	0.32		
	2 horas	3	4.72	0.19		
10 μ M	30 Min	3	4.67	0.9	15.21	0.00
	1 Hora	3	7.21	0.42		
	2 horas	3	4.97	0.4		

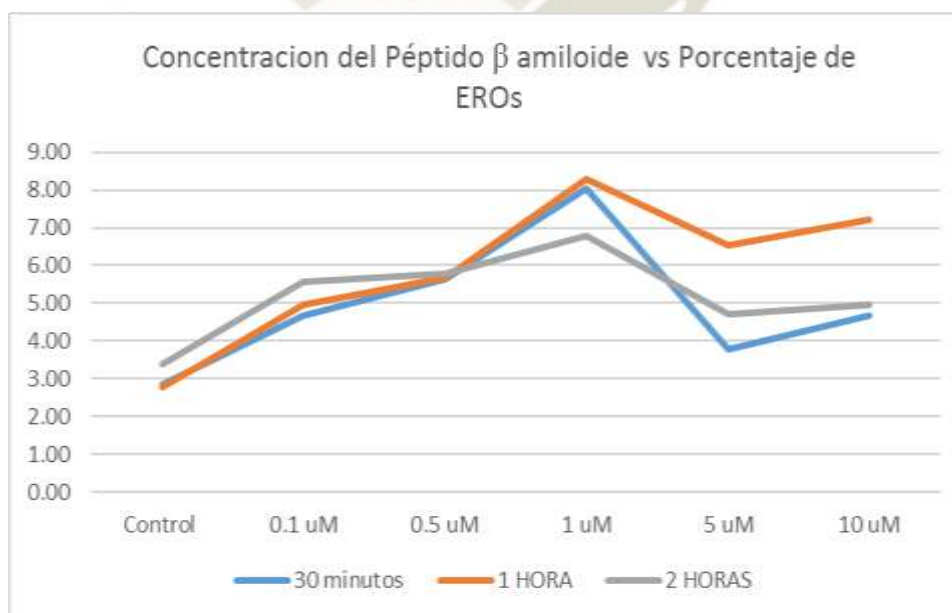


Figura N° 20 Porcentaje de EROs vs Concentración del Péptido β amiloide

b) EVALUACION DE LA CONCENTRACION DEL PEPTIDO β AMILOIDE

El mayor porcentaje de EROs generado fue cuando las células fueron expuestas a una concentración de 1 uM del péptido tanto a los 30 min como la hora y dos horas, valores que presentan una diferencia significativa comparado con el Control. Se sabe el péptido β amiloide puede producir un incremento de la viabilidad en células expuestas a concentraciones mayores a 5 uM como mecanismo de protección contra agentes exógenos, por esta razón puede explicarse la disminución del porcentaje de EROs en células que tienen mayores concentraciones del péptido (66) (67).

TABLA N° 16 : COMPARACIÓN DE CONCENTRACIONES DEL PÉPTIDO β AMILOIDE EN CADA PERIODO DE EXPOSICIÓN

Tiempo de exposición	Variable dependiente		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
30 Min	Control	0.1 uM	-1,83667*	0.37	0.00	-3.09	-0.59
		0.5 uM	-2,81000*	0.37	0.00	-4.06	-1.56
		1.0 uM	-5,20000*	0.37	0.00	-6.45	-3.95
		5.0 uM	-0.93	0.37	0.20	-2.18	0.32
		10 uM	-1,83667*	0.37	0.00	-3.09	-0.59
1 Hora	Control	0.1 uM	-2,188333*	0.32	0.00	-3.25	-1.13
		0.5 uM	-2,893333*	0.32	0.00	-3.95	-1.83
		1.0 uM	-5,516667*	0.32	0.00	-6.58	-4.46
		5.0 uM	-3,760000*	0.32	0.00	-4.82	-2.70
		10 uM	-4,436667*	0.32	0.00	-5.50	-3.38
2 Hora	Control	0.1 uM	-2,17333*	0.34	0.00	-3.33	-1.02
		0.5 uM	-2,39333*	0.34	0.00	-3.55	-1.24
		1.0 uM	-3,39333*	0.34	0.00	-4.55	-2.24
		5.0 uM	-1,32667*	0.34	0.02	-2.48	-0.17
		10 uM	-1,38000*	0.34	0.02	-2.53	-0.23

5. EVALUACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENOS EN CELULAS PRETRATADAS CON EXTRACTO DE MACA Y LA MACAMIDA SINTETICA N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA Y PEPTIDO β AMILOIDE

EL objetivo principal de este trabajo fue investigar si los extractos pentánicos de los ecotipos de macas presentes en el país y la macamidas sintética N-benciloctadienildecanamida , pueden influir en la disminución de las especies reactivas de oxígeno en células que fueron expuestas al péptido β amiloide , dado que los extractos pentanicos han demostrado tener un efecto neuroprotector (63).

TABLA N° 17 : PORCENTAJE DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CELULAS DE NEUROBLASTOMA PRE TRATADAS CON DIFERENTES MACAS

GRUPO	PORCENTAJE DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO		
	MACA NEGRA	MACA ROJA	MACA AMARILLA
Control	2.07	1.78	2.00
Control DMSO	5.90	5.83	5.63
Control DMSO + β amiloide	8.67	9.08	9.56
0.5 ppm	4.90	7.66	7.57
10.ppm	7.87	9.65	9.08
50 ppm	8.40	10.17	10.54

Como disolvente de los extractos pentanicos se utilizó el El DMSO o dimetilsulfoxido, este es un disolvente aprótico y altamente polar. Por ello, es miscible tanto con el agua como con disolventes orgánicos como alcoholes, cetonas etc. Puede formar complejos en sistemas biológicos pero presenta una toxicidad a concentraciones elevadas , por eso se determinó el efecto sobre el stress oxidativo cuando se da sólo y en combinación. (Tabla N° 17)

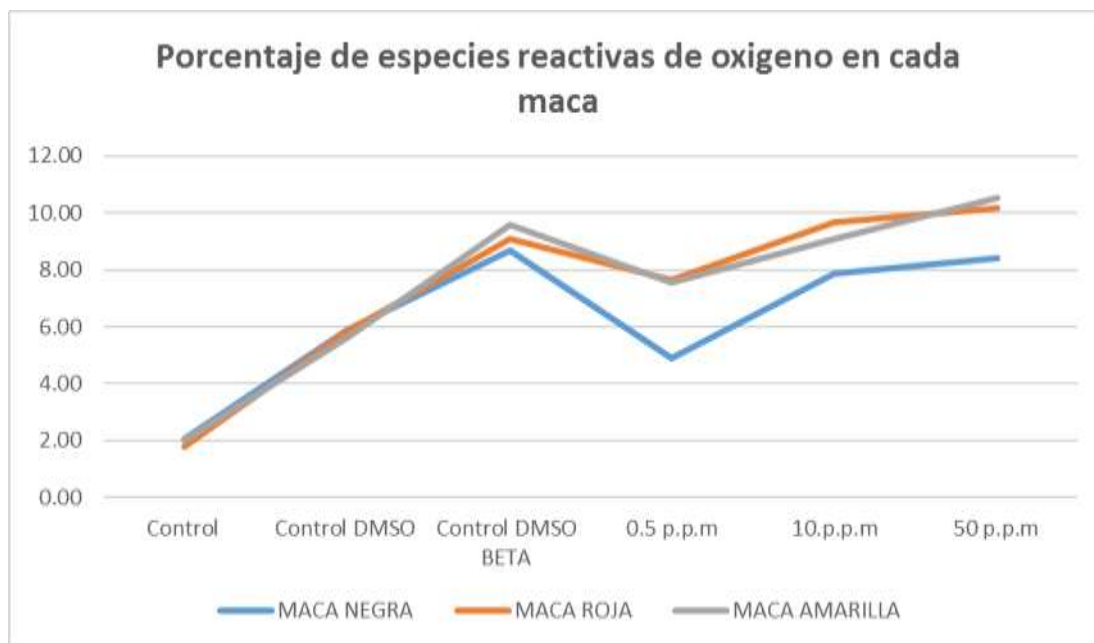


Figura N° 21 Porcentaje de especies reactivas de oxígeno en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y pre tratadas con diferentes macas

La concentración escogida de péptido β amiloide para generar el EROs en las células fue de 1 μ M y esta solución se aplicó luego de pretratar a las células con los extractos de maca y la macamida sintética N-bencil-octadienildecánamida durante 24 horas .

Se escogieron tres concentraciones de cada maca para evaluar la concentración que puede disminuir el EROs en comparación con el Control, las concentraciones escogidas para cada tipo de maca fueron 0.5 ; 10 y 50 ppm respectivamente. Mientras que las concentraciones escogidas para la macamida sintética N-bencil-octadienildecánamida fueron de 0.01, 0.5 y 10 μ M. Además se trabajó con un control conformado por las células que sólo se les puso medio completo y un control con DMSO , esto con la finalidad de evaluar si éste compuesto utilizado para preparar las soluciones de los extractos pentánicos y de la macamida sintética puede generar EROs solo.

TABLA N° 18 ANOVA PARA LA EVALUACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CELULAS PRETRATADAS CON EXTRACTO DE MACA Y LA MACAMIDA SINTETICA N-BENCIL-OCTADIENILDECANAMIDA EXPUESTAS AL PEPTIDO β AMILOIDE

Variable Dependiente		N	Media	Desviación estándar	F	Sig.
Maca Negra	Control	3	2.07	0.25	76.99	0
	Control DMSO	3	5.9	0.39		
	Control DMSO + β amiloide	3	8.67	0.34		
	0.5 ppm	3	4.9	0.5		
	10 ppm	3	7.87	0.73		
	50 ppm	3	8.4	0.64		
Maca Roja	Control	3	1.78	0.22	58.13	0
	Control DMSO	3	5.83	0.46		
	Control DMSO + β amiloide	3	9.08	0.72		
	0.5 ppm	3	7.66	0.53		
	10 ppm	3	9.65	0.94		
	50 ppm	3	10.17	1.07		
Maca Amarilla	Control	3	2	0.19	129.2	0
	Control DMSO	3	5.63	0.34		
	Control DMSO + β amiloide	3	9.56	0.62		
	0.5 ppm	3	7.57	0.39		
	10 ppm	3	9.08	0.23		
	50 ppm	3	10.54	0.8		
N-benciloctadienil decanamida	Control	3	2.32	0.33	69.8	0
	Control DMSO	3	5.81	0.51		
	Control DMSO + β amiloide	3	9.1	0.6		
	0.5 ppm	3	4.93	0.46		
	10 ppm	3	5.61	0.53		
	50 ppm	3	3.7	0.39		

En la tabla N° 18 se observa que existe una diferencia significativa entre los grupos de cada variedad de maca y de la macamida sintética N-bencil-octadienildecanamida a un nivel de significancia de 0.05. Los porcentajes de EROs en células expuestas al DMSO únicamente fueron elevados siendo esta diferencia significativa en comparación con el control, se sabe que este agente químico puede provocar toxicidad en concentraciones elevadas, pero en los datos de la tabla N° 7 se evidencia que la maca aplicada sola puede

contrarestar los efectos producidos al disminuir el porcentaje de EROs a las 24 horas.

Al realizar el análisis de comparaciones múltiples entre grupos de cada maca se observa que la maca negra y amarilla en la concentraciones de 0.5 ppm redujeron de manera significativa el porcentaje de EROs comparado con el grupo expuesto a DMSO y péptido β amielode (DMSO BETA). Mientras que la concentración de 50 ppm no generó una disminución significativa del porcentaje de EROs en los tres tipos de maca (tabla N°19)

Si bien se observa que la maca roja produjo una disminución de los valores de EROS a concentraciones de 0.5 y 10 ppm (Tabla N° 17) esta disminución no fue significativa , en contraste con la maca amarilla que si logró una disminución significativa a una concentración a esas mismas concentraciones.

Se puede considerar también que a partir de concentraciones mayores a 50 ppm el porcentaje de EROs aumenta en las tres variedades de maca.

Las concentraciones ideales para disminuir EROs en la macamida sintética N-benciloctadienildecanamida empleada fue de 0.05; 0.5 y 10 uM ya que se observó que existe una diferencia significativa en las tres concentraciones comparadas con el control.

La maca como comúnmente se conoce en nuestro país, ha sido utilizado por años por pobladores de zonas alto andinas especialmente ubicados en la sierra central. Las personas que consumen las raíces de esta planta manifiestan mejoras en el estado físico y , mental de acuerdo a la información recogida. Por este motivo existen varios estudios para evaluar el efecto en distintos órganos y/o células diana.

**TABLA N°19 : COMPARACIONES MÚLTIPLES CÉLULAS PRETRATADAS CON
EXTRACTO DE MACA Y MACAMIDA SINTÉTICA N-
BENCILOCTADIENILDECANAMIDA EXPUESTAS AL PÉPTIDO β AMILOIDE**

Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Maca Negra	Control	Control DMSO	-3,83333 [*]	0.4112	0.00	-5.2145	-2.4522
		Control DMSO + β amiloide	-6,60667 [*]	0.4112	0.00	-7.9878	-5.2255
		0.5 ppm	-2,83333 [*]	0.4112	0.00	-4.2145	-1.4522
		10 ppm	-5,80667 [*]	0.4112	0.00	-7.1878	-4.4255
		50 ppm	-6,33000 [*]	0.4112	0.00	-7.7112	-4.9488
	Control DMSO + β amiloide	0.5 ppm	3,77333 [*]	0.4112	0.00	2.3922	5.1545
		10 ppm	0.8	0.4112	0.42	-0.5812	2.1812
		50 ppm	0.27667	0.4112	0.98	-1.1045	1.6578
Maca Roja	Control	Control DMSO	-4,05000 [*]	0.58458	0.00	-6.0136	-2.0864
		Control DMSO + β amiloide	-7,30000 [*]	0.58458	0.00	-9.2636	-5.3364
		0.5 ppm	-5,87333 [*]	0.58458	0.00	-7.8369	-3.9098
		10 ppm	-7,87000 [*]	0.58458	0.00	-9.8336	-5.9064
		50 ppm	-8,39000 [*]	0.58458	0.00	-10.3536	-6.4264
	Control DMSO + β amiloide	0.5 ppm	1.42667	0.58458	0.22	-0.5369	3.3902
		10 ppm	-0.57	0.58458	0.92	-2.5336	1.3936
		50 ppm	-1.09	0.58458	0.47	-3.0536	0.8736
Maca Amarilla	Control	Control DMSO	-3,63000 [*]	0.39242	0.00	-4.9481	-2.3119
		Control DMSO + β amiloide	-7,56333 [*]	0.39242	0.00	-8.8815	-6.2452
		0.5 ppm	-5,57667 [*]	0.39242	0.00	-6.8948	-4.2585
		10 ppm	-7,08000 [*]	0.39242	0.00	-8.3981	-5.7619
		50 ppm	-8,54667 [*]	0.39242	0.00	-9.8648	-7.2285
	Control DMSO + β amiloide	0.5 ppm	1,98667 [*]	0.39242	0.00	0.6685	3.3048
		10 ppm	0.48333	0.39242	0.81	-0.8348	1.8015
		50 ppm	-0.98333	0.39242	0.20	-2.3015	0.3348
N-benciloctadienildecanamida.	Control	Control DMSO	-3,49333 [*]	0.38886	0.00	-4.7995	-2.1872
		Control DMSO + β amiloide	-6,78667 [*]	0.38886	0.00	-8.0928	-5.4805
		0.5 ppm	-2,61667 [*]	0.38886	0.00	-3.9228	-1.3105
		10 ppm	-3,29333 [*]	0.38886	0.00	-4.5995	-1.9872
		50 ppm	-1,38667 [*]	0.38886	0.04	-2.6928	-0.0805
	Control DMSO + β amiloide	0.05 uM	4,17000 [*]	0.38886	0.00	2.8638	5.4762
		0,5 uM	3,49333 [*]	0.38886	0.00	2.1872	4.7995
		10 uM	5,40000 [*]	0.38886	0.00	4.0938	6.7062

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Diendome Leme y colaboradores demostraron que la maca negra en combinación con la ruda, mejoran actividades reproductivas masculinas por el aumento de los espermatozoides, Mientras que la maca roja ha demostrado efectos antagonistas en la producción de la hiperplasia de próstata , este estudio fue realizado por Gonzales y colaboradores.

Un estudio de los efectos de la maca sobre la función cognitiva evaluó la acción de tres variedades de maca (roja, negra y amarilla) sobre el aprendizaje en ratones ovariectomizados utilizando la prueba de “búsqueda de agua”. Dicho estudio determinó que la maca negra tiene el mejor efecto sobre el aprendizaje espacial (61) resultado que coincide con los obtenidos en esta investigación debido a que se tubo resultados significativos en las células expuestas al extracto pentanico de la maca negra además de la maca amarilla .

En otro estudio se trabajó con extractos acuosos e hidroalcohólicos de maca negra, y se vio que se logró revertir el daño cognitivo inducido por la escopolamina en ratones macho. La escopolamina es un antagonista de receptores muscarínicos que imita de manera aguda la enfermedad de Alzheimer (62). Además, se demostró que ambos extractos de maca negra inhibieron la actividad de la acetilcolinesterasa, sin modificar los niveles de monoamino oxidasa.

EL objetivo de trabajar con el extracto pentanico de las distintas variedades de la maca fue el de aislar las macamidas , moléculas que actúan de manera similar a los cannabinoides por lo que se considera que tengan un mecanismo de neuroprotección similar.

La actividad neuroprotectora de la maca también ha sido estudiada usando en otros modelos experimentales tanto *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, el pretratamiento con el extracto pentánico de maca mejora la viabilidad de las neuronas de langostas, ante la exposición a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de forma dependiente de la concentración.

En ratas se observó que el extracto pentánico presenta una potencial aplicación como neuroprotector en ratas con infarto cerebral por oclusión de la arteria cerebral media.(63).

Por lo tanto el extracto pentánico de la maca negra y amarilla presenta efectos beneficios en la disminución de las especies reactivas de oxígeno a concentraciones menor de 0.5 ppm y la macamida sintética Nbenciloctadienildecanamida a concentraciones menores de 10 μ M.



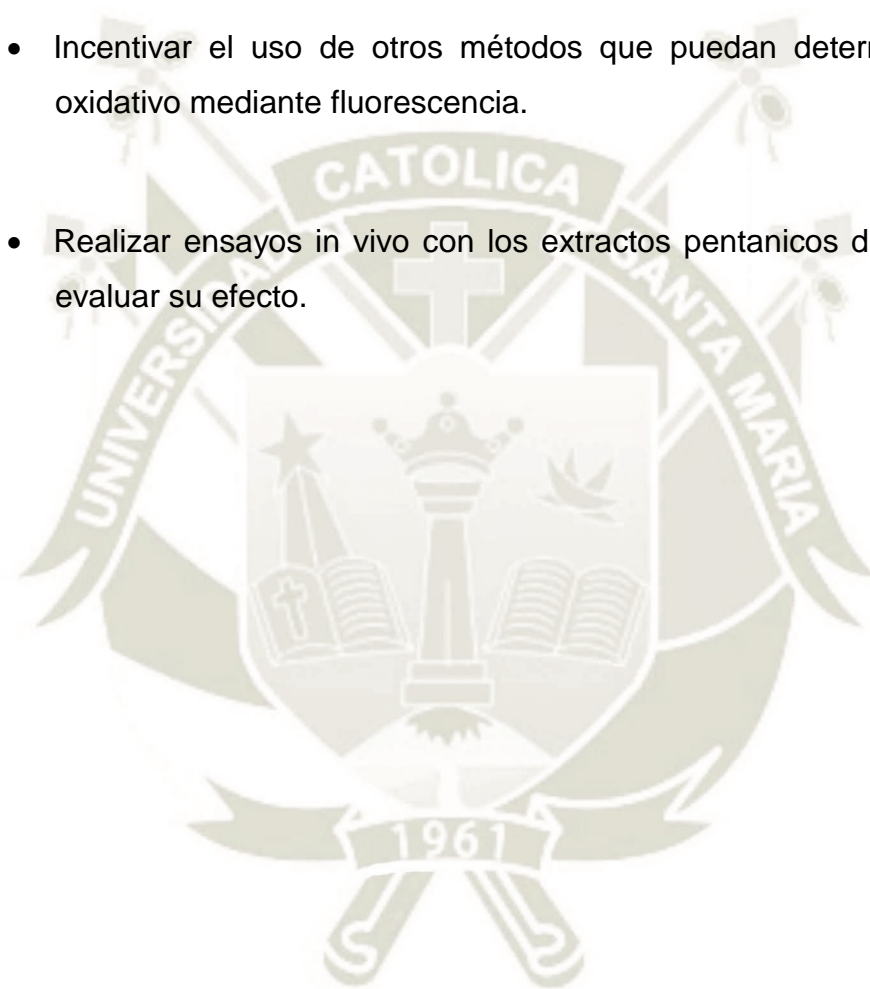
CAPITULO IV

CONCLUSIONES

- Los extractos pentánicos de las macas negra, roja y amarilla disminuyeron el porcentaje de especies reactivas de oxígeno de manera significativa en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas en un periodo de 24 horas.
- La concentración de peróxido de hidrógeno que genero mayor porcentaje de especies reactivas de oxígeno cuantificadas con el método de oxidación del dihydroetidium fue de 100 uM durante 1 hora de exposición.
- La concentración de péptido β amiloide que generó mayor porcentaje de especies reactivas de oxígeno cuantificadas con el método de oxidación del dihydroetidium fue de 1 uM durante 1 hora de exposición.
- El péptido β amiloide a concentración 1uM produjo una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno comparado con el peróxido de hidrógeno a una concentración de 100 uM en el mismo tiempo de exposición de una hora.
- Los extractos pentánicos de la maca negra y amarilla presentaron un mejor efecto protector frente a la maca roja al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno a concentraciones menores de 0.5 ppm. y el efecto protector de la macamida sintética N-benciloctadienildecenamida se logró con concentraciones menores a 10 uM

SUGERENCIAS

- Evaluar el efecto de los extractos pentánicos en otras patologías utilizando líneas celulares específicas.
- Incentivar el uso de otros métodos que puedan determinar el estrés oxidativo mediante fluorescencia.
- Realizar ensayos in vivo con los extractos pentánicos de la maca para evaluar su efecto.



REFERENCIAS

1. MP Mattson. **Rutas hacia y lejos de la enfermedad de Alzheimer** Nature (2004) , 430 (7000) , pp. 631 – 639 CrossRef registro en Scopus
2. C. Cheignon M. Tomas D. Bonnefont Rousselot P Faller C. Hureau F. Collin. **Estress oxidativo y el péptido Beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer** . Redox Biología Volumen 14, abril del 2018.
3. LO Soto-Rojas , F. de la Cruz-López , MAO Torres , A. Viramontes-Pintos , M. del Carmen Cárdenas-Aguayo , MA Meraz-Ríos , C. Salinas-Lara , B. Florán-Garduño , J. Luna –Muñoz. **Neuroinflamación y alteración de la barrera hematoencefálica en la enfermedad de Alzheimer.** 2010
4. I. Zerr (Ed.) , **La enfermedad de Alzheimer: desafíos para el futuro** , InTech (2015)
5. Cacabellos Ramon . **Enfermedad de Alzheimer presente terapéutico y retos futuros.** revista colombiana de psiquiatría / vol. xxx / nº 3
6. M. Prince, A. Wimo, M. Guerchet, G. Ali, Y. Wu, M. Prina, World Alzheimer Report 2015. **El impacto global de la demencia. Un análisis de prevalencia, incidencia, costo y tendencias**, Alzheimer's Disease International, Londres, 2015.
7. B. Duthey **Enfermedad de Alzheimer y otras demencias, medicamentos prioritarios para Europa y el mundo. "Un enfoque de salud pública para la innovación"** documento de antecedentes 6.11, 2004, pp. 1-74.
8. Lynn M. Bekris , PhD,¹ Chang-En Yu , PhD,¹ Thomas D. Bird , MD,² y Debby W. Tsuang , MD, MSc. **Genética de la enfermedad de Alzheimer.** J Geriatr Psychiatry Neurol. 2010 diciembre; 23 (4): 213-227.

9. GG Glenner , CW Wong **La enfermedad de Alzheimer: informe inicial de la purificación y caracterización de una nueva proteína amiloide cerebrovascular** Biochem. Biophys. Res. Commun. , 120 (3) (1984) , pp. 885 - 890ArtículoDescargar PDFVer registro en Scopus
- 10.L. Minati , T. Edginton , MG Bruzzone , G. Giaccone **Conceptos actuales en la enfermedad de Alzheimer: una revisión multidisciplinaria** A.m. J. Alzheimer'S. Dis. Otro Demento. , 24 (2) (2009) , pp. 95 – 121 CrossRefVer registro en Scopus
- 11.M. Goedert **.Neurodegeneración Enfermedades de Alzheimer y Parkinson: el concepto de priones en relación con Abeta, tau y alfa-sinucleína ensamblados** Science , 349 (6248) (2015) , p. 1255555
- 12.Iqbal , K, YC Tung , M. Quinlan , HM Wisniewski, LI Binder **Fosforilación anormal de la proteína asociada a microtúbulos tau (tau) en la patología del citoesqueleto de Alzheimer** Proc. Natl . Acad. Sci. EE.UU. 83 (13) (1986) , pp. 4913 – 4917
- 13.Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. **Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments.** Nature 1992;357(6378):500–503. [PubMed: 1608449]
- 14.Schroeter EH, Ilagan MX, Brunkan AL, et al. **A presenilin dimer at the core of the gammasecretase enzyme: insights from parallel analysis of Notch 1 and APP proteolysis.** Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(22):13075–13080. [PubMed: 14566063]
- 15.Roses AD, Saunders AM, Alberts MA, et al. **Alelo E4 de la apolipoproteína y riesgo de demencia.** JAMA. 1995; 273 : 374-375. respuesta del autor 375-l376. [[PubMed](#)]
- 16.Coon KD, Myers AJ, Craig DW, y col. **Un estudio de asociación de genoma completo de alta densidad revela que el APOE es el**

- principal gen de susceptibilidad para la enfermedad de Alzheimer esporádica de inicio tardío. *J Clin Psychiatry*. 2007; 68 (4): 613 - 618. [[PubMed](#)]
- 17.E. Karran, M. Mercken, B. De Strooper, **The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics**, *Nat. Rev. Drug Discov.* 10 (9) (2011) 698–712. C. Cheignon et al. *Redox Biology* 14 (2018) 450–464
- 18.D.M. Holtzman, J.C. Morris, A.M. Goate, **Alzheimer's disease: the challenge of the second century**, *Sci. Transl. Med.* 3 (77) (2011) (77sr1-77sr1)
- 19.Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición. Salvador Zuliban departamento de Geriatria.
20. ☆ Ricardo F. Allegri, Raúl L. Arizaga, Claudia V. Bavec, Liliana P. Colli, Ignacio Demey, María C. Fernández, Silvina A. Frontera, María L. Garau, Julio J. Jiménez, Ángel Golimstok, Janus Kremer, Edith Labos, Carlos A. Mangone, Juan A. Ollari*, Galeno Rojas, Omar Salmini, Jorge A. Ure y Daniel R. Zuin **Enfermedad de Alzheimer. Guía de práctica clínica** NEUROL ARG. 2011;3(2):120-137.
- 21.Beers M. Porter R. **El Manual de Merck de diagnóstico y tratamiento** . decimo novena edición ELservier.
- 22.Wang, X., Wang, W., Li, L., Perry, G., Lee, H., & Zhu, X. (2014). **Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease**. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842(8), 1240–1247.
- 23.Cheeseman K, Slater T. **An introduction to free radical biochemistry**., editors. Free radicals in medicine. London (UK): Churchill Livingstone, 1993.
- 24.Halliwell B, Chirico S. **Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance**. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715 – 725. 16.

25. Halliwell B, Gutteridge J, Cross C. **Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?** J Lab Clin Med 1992; 119: 598 – 620.
26. Constanza Corrales Lucía MSc1, Maira María Muñoz Ariza. **Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno.**
27. Boveris A. **Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues.** Buenos Aires (Argentina). 1998; 58: 350- 356. 44
28. Días J, Serramo E, Acosta F, et al. **References intervals for four biochemistry analyttes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma.** Clin Chem. 1998; 44(10): 2215 – 2217.
29. Fridovich I. **Oxygen toxicity: a radical explanation.** J. Exp. Biol. 1998, 201: 1-15.
30. BarBJ, Araujo A, Fernandes T, et al. **Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones.** Braz J Med Biol Res. 2002; 35: 1075 – 1081.
31. Halliwell B, Gutteridge J. **Free radicals in Biology and Medicine.** Tercera edición. Oxford, New York, 2000.
32. Butterfield DA, Lauderback CM. **La peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas en el cerebro de la enfermedad de Alzheimer: causas potenciales y consecuencias que implican el estrés oxidativo de radicales libres asociado al beta-péptido amiloide.** Radic libre. Biol. Medicina. 2002; 32 (11): 1050 - 1060.
33. Thapa, A., & Carroll, N. J.. **Dietary Modulation of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease.** *International Journal of Molecular Sciences*, (2017). 18(7), 1583.

34. Aksenova MV, Aksenov MY, Payne RM, Trojanowski JQ, Schmidt ML, Carney JM, Butterfield DA, Markesbery WR **Oxidación de proteínas citosólicas y expresión de creatina quinasa B en el lóbulo frontal en diferentes trastornos neurodegenerativos** *Dement Geriatr Cogn Disord.* 1999 Mar-Abr; 10 (2): 158
35. Reed TT, Pierce WM Jr, Turner DM, Markesbery WR, Butterfield DA **Identificación proteómica de proteínas nitradas del cerebro en el lóbulo parietal inferior de la enfermedad de Alzheimer.** *J Cell Mol Med.* 2009 agosto; 13 (8B): 2019-29.
36. Anderson AJ, Su JH, Cotman CW **Daño del ADN y apoptosis en la enfermedad de Alzheimer: colocación con inmunoreactividad c-Jun, relación con el área del cerebro y efecto del retraso post mortem.** *J Neurosci.* 1996 1 de marzo; 16 (5): 1710-9.
37. Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Jenner P, Halliwell **Una evaluación del daño oxidativo a proteínas, lípidos y ADN en el cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer.** *J Neurochem.* 1997 mayo; 68 (5): 2061-9.
38. Buena PF, Werner P, Hsu A, Olanow CW, Perl DP. **Evidencia de daño oxidativo neuronal en la enfermedad de Alzheimer.** *Am J Pathol.* 1996; 149 : 21-28
39. Mecocci P, Macgarvey U, Beal MF. **El daño oxidativo al ADN mitocondrial aumenta en la enfermedad de Alzheimer.** *Ann Neurol.* 1994; 36 : 747-751
40. Ito S., Ohtsuki S., Kamiie J., Nezu Y., Terasaki T. **El aclaramiento cerebral del péptido amiloide-beta humano (1-40) a través de la barrera hematoencefálica se reduce por autoagregación y formación de baja complejos de ligandos de proteína-1 relacionados con receptores de lipoproteínas de densidad.** *J. Neurochem.* 2007; 103 (6): 2482-2490.

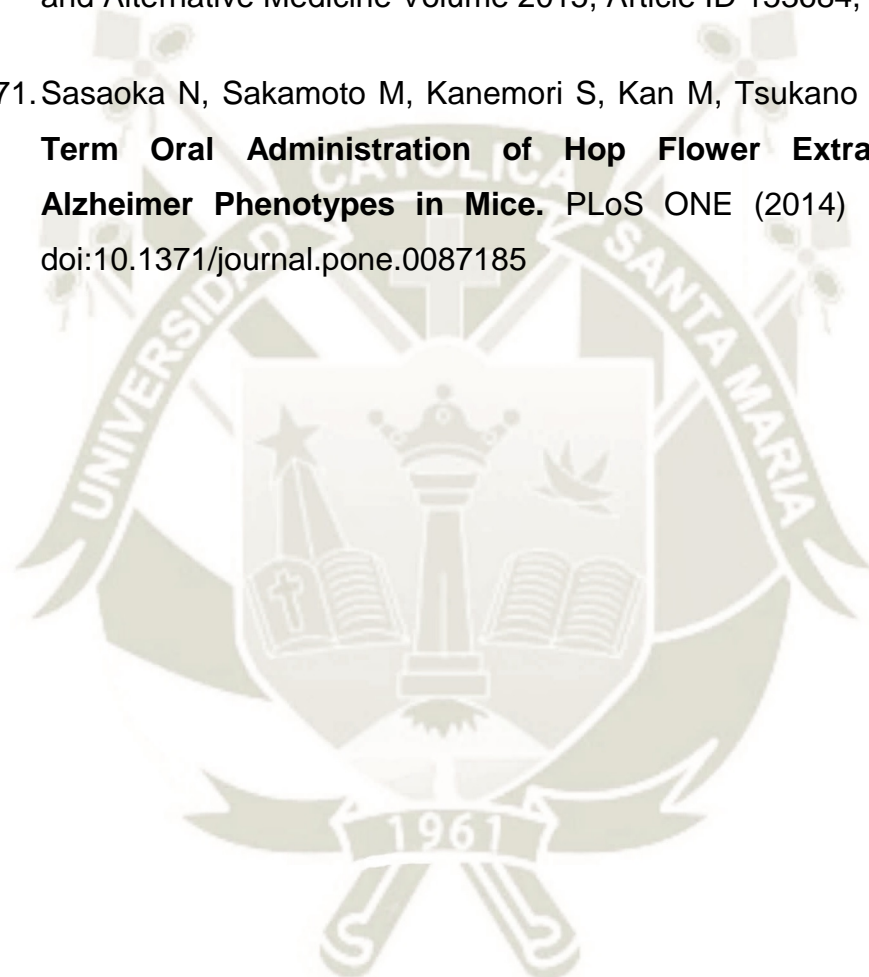
41. Sagare A., Deane R., Bell RD, Johnson B., Hamm K., Pendu R., Marky A., Lenting PJ, Wu Z., Zarcone T., Goate A., Mayo K., Perlmutter D., Coma M., Zhong Z., Zlokovic BV **Liquidación de amiloide-beta por receptores de lipoproteína circulantes**. Nat. Medicina. 2007; 13 (9): 1029-1031
42. Bandyopadhyay U. Das D, Banerjee R. **Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis**. Curr Sci. 1999; 77: 658 – 666
43. Borella M, Varela Q. **Antioxidantes enzimáticos. En: Radicais libres e a resposata celular a estress oxidativo**. Editora da ULBRA. Canoas-RS (Brasil). 2004: 35 – 49.
44. <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells>
45. Pryor, WA, JP Stanley y E. Blair. **Autooxidación de ácidos grasos poliinsaturados: II. Un mecanismo sugerido para la formación de materiales reactivos para TBA a partir de endoperóxidos de tipo prostaglandina**. Lípidos (1976), 11: 370-379.
46. Zielonk, J, J. Vasquez-Vivar, and B. Kalyanaram **Detection of 2-hydroxyethidium in Cellular Systems: a Unique Marker Product of Superoxide and Hydroethidine**, Nature (2008) Protocols, 3(1):8-21.
47. Reszka, KJ, BA Wagner, CP Burns, y BE Britigan. **Efectos de los sustratos de peroxidasa en el ensayo Amplex red / peroxidase: propiedades antioxidantes de las antraciclinas**. Anal. Biochem (2005).. 342: 327-337.
48. [Cttps://www.vanderbilt.edu/viibre/cellculturebasicseu.pdf](https://www.vanderbilt.edu/viibre/cellculturebasicseu.pdf). Culture basics handbook
49. [Http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/cultivos%20celulares/aplica_cultivos_celulares_2007.pd](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/cultivos%20celulares/aplica_cultivos_celulares_2007.pd)

50. Bautista Humpire, Adler Shiuji. **“Evaluación in vitro del efecto neuroprotector e inhibidor de caspasas 3 y 9 de los curcuminoides en células de neuroblastoma B-35 y SH-SY5Y sometidas a estrés oxidativo, arequipa 2013”** universidad católica de santa maría. 2013
51. Rondón Ortiz, Alejandro Nico Villanueva Sardón, Rodrigo José . **“Efectos de Isoniacida, Vigabatrina, Gabapentina y Extracto Pentánico de *Lepidium meyenii* I. (maca) sobre los niveles de gaba producidos por neuroblastoma B-35”** Universidad Católica de Santa María. 2014
52. Lembè, D. M., Gasco, M., & Gonzales, G. F. **Synergistic effect of the hydroalcoholic extract from *Lepidium meyenii* (Brassicaceae) and *Fagara tessmannii* (Rutaceae) on male sexual organs and hormone level in rats.** *Pharmacognosy Research*, (2014). 6(1), 80–86.
53. Gonzales-Arimborgo, C., Yupanqui, I., Montero, E., Alarcón-Yaquetto, D. E., Zevallos-Concha, A., Caballero, L., ... Gonzales, G. F. **Acceptability, Safety, and Efficacy of Oral Administration of Extracts of Black or Red Maca (*Lepidium meyenii*) in Adult Human Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study.** *Pharmaceuticals*, (2016). 9(3), 49
54. Meissner, H. O., Mscisz, A., Kedzia, B., Pisulewski, P., & Piatkowska, E. **Peruvian Maca: Two Scientific Names *Lepidium Meyenii* Walpers and *Lepidium Peruvianum* Chacon – Are They Phytochemically-Synonymous ?** *International Journal of Biomedical Science* (2015). : *IJBS*, 11(1), 1–1
55. Gonzales GF, Gasco M., Malheiros-Pereira A., Gonzales-Castañeda C. **Efecto antagonista de *Lepidium meyenii* (maca roja) sobre la hiperplasia prostática en ratones adultos.** *Andrologia*. 2008; 40 : 179-185. doi: 10.1111 / j.1439-0272.2008.00834.
- 56.4. Gonzales C., Cárdenas-Valencia I., Leiva-Revilla J., Anza-Ramírez C., Rubio J., Gonzales GF **Efecto de diferentes variedades de Maca**

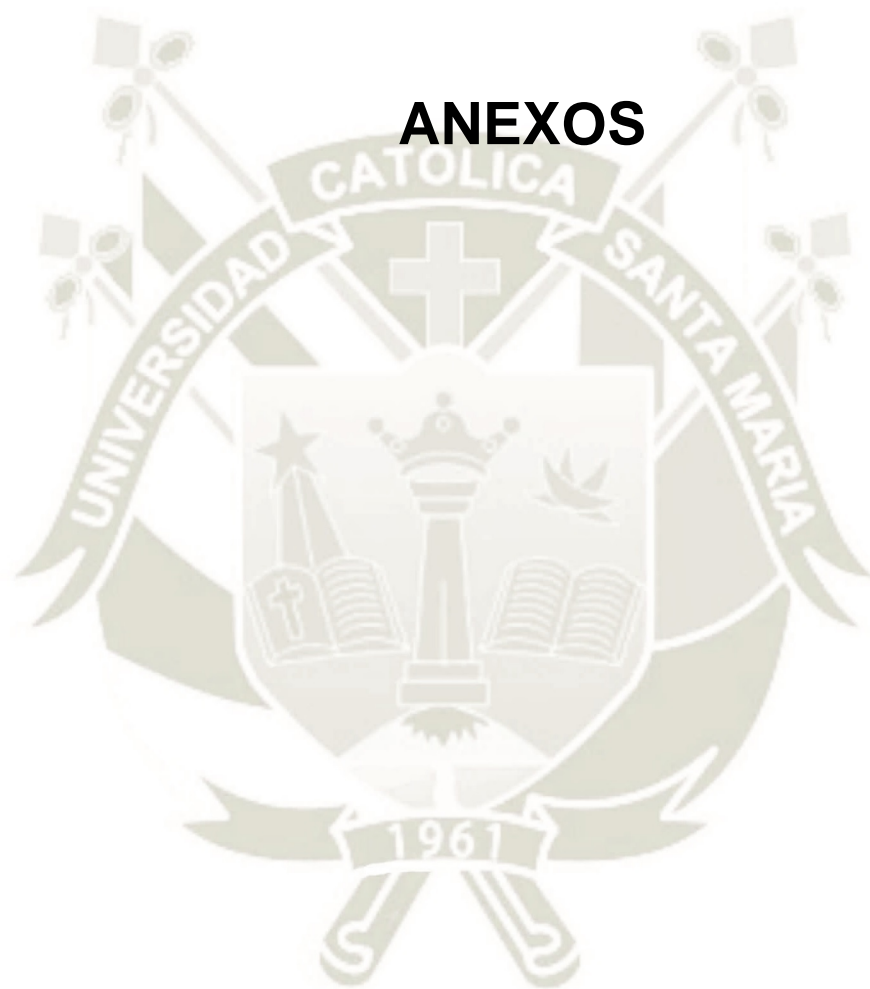
- (*Lepidium meyenii*) sobre la estructura ósea en ratas ovariectomizadas. Forsch. Komplementmed. 2010; 17 : 137-143. doi: 10.1159 / 000315214.
57. Gonzales GF, Gonzales-Castañeda C., Gasco M. **Una mezcla de extractos de plantas peruanas (maca negra y yacón) mejora el conteo de espermatozoides y reduce la glucemia en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina** . Toxicol . Mech . Métodos. 2013; 23 : 509-518. doi: 10.3109 / 15376516.2013.785656.
- 58.6. Rubio J., Yucra S., Gasco M., Gonzales GF **Efecto de la dosis-respuesta de la maca negra (*Lepidium meyenii*) en ratones con deterioro de la memoria inducido por etanol**. Toxicol. Mech. Métodos. 2011; 21 : 628-634.
59. Alvarez Salazar Evelyn Katy **Producción de Mrna para citoquinas hematopoyéticas (il-3, gm-csf e il-7) en ratones inmunosuprimidos tratados con extracto acuoso de *Lepidium meyenii* walpers (maca)** Universidad Mayor de San Marcos 2013.
60. Sifuentes-Penagos Gabriel, León-Vásquez Susan , Luz María Paucar-Menacho. **Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), cultivo andino con propiedades terapéuticas Study of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.), Andean crop with therapeutic properties** Departamento de Ingeniería Agroindustrial, Universidad Nacional del Santa Av. Universitaria s/n, Urb. Bellamar, Chimbote, Perú
61. Rubio J, Caldas M, Dávila S, Gasco M, Gonzales GF. **Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii*(Maca) on learning and depression in ovariectomized mice**. BMC Complement Altern Med. 2006;6:23.
62. Oronina TA, Belopol'skaya MV, Kheyfets IA, Dugina YL, Sergeeva SA, Epshtein OI. **Effect of ultralow doses of antibodies to S-100 protein in animals with impaired cognitive function and disturbed emotional**

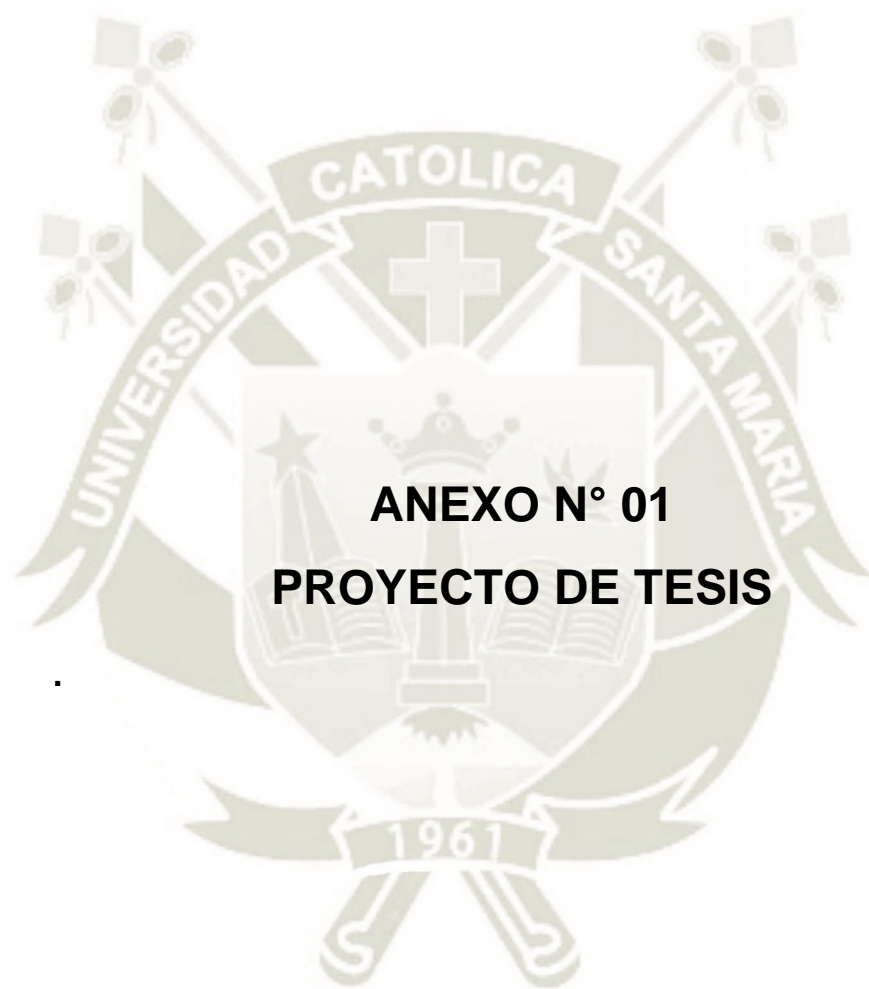
- and neurological status under conditions of experimental Alzheimer disease.** Bull Exp Biol Med. 2009;148(3):533-5
63. Pino-Figueroa A, Nguyen D, Maher TJ. **Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca).** Ann N Y Acad Sci. 2010;1199:77-85.
64. Kovalevich, J., & Langford, D. **Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology.** *Methods in Molecular Biology* (2013). (Clifton, N.J.), 1078, 9–21.
65. Shimabuku Vega Naomi Fabiola “**Composición Química de *Lepidium meyenii* walp. (maca): comparando procedencias y colores del órgano de reserva**” Universidad Peruana Cayetano Heredia-2017
66. Harvey B. Ohlsson K. Maag Lan F, **Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid- β evoked neurotoxicity in vitro.** NeuroToxicology, January 2012, Volumen 33 Issue 1, Pag 138-146.
67. Nathaniel G. N. Milton,* , Amrutha Chilumuri, Eridan Rocha-Ferreira, Amanda N. Nercessian,‡ and Maria **Ashioti Kisspeptin Prevention of Amyloid- β Peptide Neurotoxicity in Vitro.** ACS Chemical Neuroscience.
68. Norsharina Ismail 1,* , Maznah Ismail 1,2, Siti Farhana Fathy 1, Siti Nor Asma Musa 1,2, Mustapha Umar Imam 1, Jhi Biau Foo 1 and Shahid Iqba. **Neuroprotective Effects of Germinated Brown Rice against Hydrogen Peroxide Induced Cell Death in Human SH-SY5Y Cells.** International Journal of Molecular Sciences ISSN 1422-0067. Int. J. Mol. Sci. 2012, 13, 9692-9708; doi:10.3390/ijms13089692
69. Hee Ra Park, Heeeun Lee, Hwayong Park, Jong Wook Jeon, Won-Kyung Cho and Jin Yeul MaPark **Neuroprotective effects of *Liriope platyphylla* extract against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.** BMC Complementary and Alternative Medicine (2015) 15:171 DOI 10.1186/s12906-015-0679-3.

70. NurHanisah Azmi, MaznahIsmail, Norsharina Ismail, Mustapha UmarIam, Noorjahan Banu Mohammed Alitheen, and Maizatun Atmadini Abdullah. **Germinated Brown Rice Alters $A\beta(1-42)$ Aggregation and Modulates Alzheimer's Disease-Related Genes in Differentiated Human SH-SY5Y Cells.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine Volume 2015, Article ID 153684, 12 pag
71. Sasaoka N, Sakamoto M, Kanemori S, Kan M, Tsukano C, et al. **Long-Term Oral Administration of Hop Flower Extracts Mitigates Alzheimer Phenotypes in Mice.** PLoS ONE (2014) 9(1): e87185. doi:10.1371/journal.pone.0087185



ANEXOS





UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRIA DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



“Efecto de los extractos de *Lepidium Meyenii* (Maca) y de las macamidas sintéticas sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), en células de neuroblastoma B-35 expuestas al péptido Beta amiloide ”

Proyecto de Tesis para optar el Grado de
Magister en BIOQUÍMICA Y BIOLOGIA
MOLECULAR

Presentado por la Química Farmacéutica:

MOCITA HESET LOURDES

DE LA FUENTE TORRES

Asesor:

Dr. Villanueva Salas José

AREQUIPA – PERU

2018

I. PREAMBULO

Actualmente en el Perú y el mundo se ha observado un incremento del grupo etario considerado adulto mayor con cifras aumentarán en un 22 % con una expectativa de vida superior a los setenta años según la Organización Mundial de la Salud.

Por lo tanto es de esperarse que las enfermedades presentes en este grupo también aumenten. Las enfermedades neurodegenerativas ocupan un lugar importante en las causas de morbi mortalidad de las personas adultas mayores. Además el ritmo de vida, el estrés originado y la presencia de genes implicados en este tipo de enfermedades también juegan un papel importen y inicios tempranos de estas patologías.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las causas más comunes de pérdida de la memoria por lo que este investigación apunta a evaluar el efecto de los extractos de la maca sobre el estrés oxidativo producto de la actividad del péptido B amiloide uno de los principales agentes causantes de la enfermedad.

II. PLANTEAMIENTO TEORICO

1. PROBLEMA

1.1 Enunciado del problema

Efecto de los extractos de *Lepidium Meyenii* (Maca) y de las macamidas sintéticas sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) , en células de neuroblastoma B-35 expuestas al péptido Beta amiloide.

1.2 Descripción del Problema

- a. Campo : Bioquímica y Biología Molecular
- b. Área : Biología Molecular
- c. Línea : Genética

1.2.2 Análisis de Variables

VARIABLES	INDICADORES	
Independiente	Extracto pentánico de maca	<ul style="list-style-type: none"> • Variedad de maca • Condiciones de secado • Concentración de macamidas
Dependiente	Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)	<ul style="list-style-type: none"> • Porcentaje de ROS en células expuestas a peróxido de hidrogeno como control • Porcentaje de ROS en células expuestas al péptido beta amiloide • Porcentaje de ROS en células expuestas a las diferentes variedades de maca • Porcentaje de ROS en células expuestas a macamidas sintéticas <p>Porcentaje de ROS en células expuestas a las diferentes variedades de maca y al péptido beta amiloide</p>

1.2.3. Interrogantes Básicas

- ¿ Es posible que los extractos pentánicos de la maca puedan afectar la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en Células de neuroblastoma B-35 expuestas al péptido beta amiloide ?
- ¿ Es posible que los extractos pentánicos de la maca puedan afectar la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) EN Células de neuroblastoma B-35?
- ¿ Es posible que el peróxido de hidrogeno en diferentes concentraciones pueda afectar la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en Células de neuroblastoma B-35 ?
- ¿ Es posible que el péptido beta amiloide en diferentes concentraciones pueda afectar la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en Células de neuroblastoma B-35 ?

1.2.4 Tipo y Nivel del problema

- El tipo de problema a investigar es experimental
- El nivel es descriptivo relacional.

1.3 Justificación.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las causas más comunes de pérdida de la memoria por lo que esta investigación apunta a evaluar el efecto de los extractos pentánicos de la maca y macamidas sintéticas sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas por la acumulación de placas proteicas de péptido beta amiloide que es el principal agente encargado de producir la EA. De tener un efecto positivo se podrá establecer los principios para nuevas alternativas en la terapia farmacológica de esta enfermedad.

3. MARCO CONCEPTUAL

3.1. Estudio Genético de la Enfermedad

La enfermedad de Alzheimer (AD) es la causa más común irreversible y progresiva de la demencia. Se caracteriza por una pérdida progresiva de la memoria y las habilidades cognitivas. La enfermedad de Alzheimer representa más del 50% de todos los casos de demencia, y en la actualidad afecta a más de 24 millones de personas en todo el mundo. Por otra parte, más de 5 millones de nuevos casos de AD se reportan cada año, y la incidencia aumenta de 1% entre las edades de 60 y 70 años y el 6% y el 8% a la edad de 85 años o mayores de esa edad ^{1,2}, y es probable que aumente como una mayor proporción de la población envejece ³.

Aproximadamente el 10% de las personas mayores de 70 años tienen pérdida de memoria significativa, y más de la mitad de estas personas tienen EA probable. Se estima que un 25% a 45% de las personas mayores de 85 años tienen demencia. ⁵ La duración de la enfermedad suele ser de 8 a 10 años, con un rango de 2 a 25 años después del diagnóstico.

El estrés oxidativo, un proceso que aumenta en el cerebro con el envejecimiento, es inducido por un desequilibrio en el estado redox, que implica la generación de exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) o la disfunción del sistema antioxidante ⁶. La cadena de transporte de electrones mitocondrial consume casi el 98% de oxígeno molecular en el complejo de citocromo oxidasa y el oxígeno restante se reduce a peróxido de hidrógeno y radicales superóxido. Durante el metabolismo normal y diversas funciones, se producen el superóxido radical de oxígeno ($O_2^{\cdot -}$) y el peróxido de hidrógeno oxidante no radical (H_2O_2) y el ácido hipocloroso ($HOCl$). Cuando la producción de ($O_2^{\cdot -}$) y (H_2O_2) se vuelve excesiva, pueden provocar daños en los tejidos que a menudo implican la generación del radical hidroxilo altamente reactivo (OH^{\cdot}) y otras moléculas oxidantes en presencia de iones catalíticos de hierro o cobre ⁷. Por consiguiente, dado que el metal cataliza reacciones redox

⁸, una de las principales formas de defensa antioxidante consiste en almacenar y transportar el hierro en formas que no catalizan la formación de radicales reactivos ⁹, como es el caso durante la lesión tisular, en que hay un aumento en la disponibilidad de hierro que puede acelerar las reacciones de radicales libres ⁹.

3.3. *Lepidium Meyenii* (Maca)

Lepidium meyenii (Maca), de la familia Brassicaceae, es una planta herbácea cultivada en la Cordillera de los Andes Centrales de nuestro país a aproximadamente 3.500-4.500 metros de altitud ¹¹

Algunos autores apuntaron propiedades farmacológicas de la Maca en el sistema reproductivo con aumento de la fertilidad ^{12,13,14,16}, en el rendimiento sexual y función eréctil ²² en la disminución de la ansiedad y depresión en las mujeres después de la menopausia²³, además de la capacidad estrogénica ²⁴, y presentó también, una función anti-proliferativa de la próstata ^{25,26,27}. La administración de la Maca también redujo los efectos producidos por el estrés, con el aumento de los niveles de corticosterona, y otros parámetros relacionados como el tamaño de las glándulas suprarrenales y úlceras inducidas por estrés, hasta la disminución de los ácidos grasos libres y niveles de glicosis plasmática ²⁸. La lipofilicidad de muchos compuestos de la Maca sugiere actividad sobre el sistema nervioso, con eso, los efectos sobre el aprendizaje y memoria fueron estudiados en ratas ovariectomizadas ²⁹ y en ratas con problemas de memoria inducida por escopolamina ³⁰. La maca es rica en metabolitos vegetales secundarios, esto podría explicar los efectos biológicos que se le atribuyen ³¹. Los macaenos y las

macamidas específicos de esta planta, son los principales compuestos activos ^{32,33}

3. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

- **Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (Review)** WEN-JUAN HUANG, XIA ZHANG and WEI-WEI CHEN Department of Neurology, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou, Jiangsu 221009, P.R. China.
- **Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid-b evoked neurotoxicity in vitro** Benjamin S. Harvey ^a, Katharina S. Ohlsson ^b, Jesper L.V. Ma[°] ^a ^g ^c, Ian F. Musgrave ^a, Scott D. Smid
- **Neuroprotective Effects of Germinated Brown Rice against Hydrogen Peroxide Induced Cell Death in Human SH-SY5Y Cells** Norsharina Ismail 1,* , Maznah Ismail 1,2, Siti Farhana Fathy 1, Siti Nor Asma Musa Mustapha Umar Imam 1, Jhi Biau Foo 1 and Shahid Iqbal
- **Long-Term Oral Administration of Hop Flower Extracts Mitigates Alzheimer Phenotypes in Mice** Norio Sasaoka¹, Megumi Sakamoto¹, Shoko Kanemori¹, Michiru Kan¹, Chihiro Tsukano Yoshiji Takemoto², Akira Kakizuka¹
- **Germinated Brown Rice Alters A β (1-42) Aggregation and Modulates Alzheimer's Disease-Related Genes in Differentiated Human SH-SY5Y Cells** Nur Hanisah Azmi,¹ Maznah Ismail,^{1,2} Norsharina Ismail,¹ Mustapha Umar Imam,¹ Noorjahan BanuMohammed Alitheen,³ andMaizatun Atmadini Abdullah

4. OBJETIVOS

General

- Evaluar el efecto de los extractos de *lepidium meyenii* y de las macamidas sintéticas sobre la producción de especies reactivas de oxígeno, en células de neuroblastoma B-35 expuestas al péptido Beta amiloide

Específicos

- Determinar el efecto que los extractos pentánicos de la maca en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en Células de neuroblastoma B-35.
- Determinar el efecto de las macamidas sintéticas en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en Células de neuroblastoma B-35.
- Determinar el efecto del peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de neuroblastoma B-35.
- Determinar el efecto del péptido beta amiloide a diferentes concentraciones en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en células de neuroblastoma B-35.

5. HIPOTESIS

La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en células expuestas al péptido beta amiloide probablemente pueda verse influenciada por los extractos pentánicos de las distintas variedades de maca y macamidas sintéticas

III. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. Técnicas e Instrumentos.-

VARIABLES	INDICADORES	TÉCNICAS	INSTRUMENTOS
Extracto pentanico de maca	<ul style="list-style-type: none"> Variedad de maca Condiciones de secado Concentración de macamidas 	Extracción por soxleth Extracción líquido-líquido	Equipo de soxleth Equipo de extracción líquido – líquido
Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)	<ul style="list-style-type: none"> Cultivo celular Producción de especies reactivas de oxígeno 	Protocolo para descongelamiento de células de neuroblastoma Protocolo para cultivo de la línea celular neuroblastoma B-35 Protocolo para la cuantificación de células Protocolo para la determinación de especies reactivas de oxígeno	Citometro de flujo Cabina de flujo laminar Incubadora de CO2 Kits de cuantificación celular Kits de cuantificación de especies reactivas de oxígeno

2. Campo de verificación

2.1. Ubicación espacial

El presente proyecto se realizará en el laboratorio de Biología Molecular H-403 de la Universidad Católica de Santa María

2.2. Ubicación temporal

EL presente proyecto se realizara entre los meses de agosto a setiembre del 2018.

2.3. Unidades de estudio

- Extracto Pentanico

Se trabajará con tres variedades de maca : amarilla , roja y negra cultivadas en el departamento de Junín

- Especies reactivas de oxigeno

Se realizará cultivo celulares de la línea neuroblastoma B-35 en placas de Elisa y las cuales serán expuestas a diferentes concentraciones de péptido beta amiloide y maca

3. Estrategia de Recolección de datos

Se utilizaran programas estadísticos como spss y excel

Cronograma de Trabajo

	1 ^{era} semana	2 ^{da} semana	3 ^{era} semana	4 ^{ta} semana
Presentación del proyecto				
Aprobación del proyecto				
Realización de la parte experimental				
Procesamiento de datos				
Elaboración del borrado				
Aprobación y sustentación				

BIBLIOGRAFIA

1. Lynn M. Bekris, PhD1, Chang-En Yu, PhD1, Thomas D. Bird, MD2, and Debby W. Tsuang Bases genéticas de alzheimer Geriatr Psychiatry Neurol. 2010 December ; 23(4): 213–227. doi:10.1177/0891988710383571
2. Mayeux R. Epidemiology of neurodegeneration. Annu Rev Neurosci 2003;26(6):81–104. [PubMed:
3. Ferri CP, Prince M, Brayne C, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study.Lancet 2005;366(9503):2112–2117. [PubMed: 16360788
4. Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, et al. Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease:prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. Am J Hum Genet 1999;65(3):664–670.[PubMed: 10441572]
5. . Andreyev AY, Kushnareva YE and Starkov AA: Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry (Mosc) 70: 200-214, 2005. 2.
6. Leeuwenburgh C and Heinecke JW: Oxidative stress and antioxidants in exercise. Curr Med Chem 8: 829-838, 2001. 3. Sheldon
7. RA: Metal-catalyzed oxidations of organic compounds: mechanistic principles and synthetic methodology including biochemical processes. Elsevier, New York, NY, 2012.
8. 4. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M and Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact 160: 1-40, 2006
9. Brickell KL, Steinbart EJ, Rumbaugh M, et al. Early-onset Alzheimer disease in families with lateonset Alzheimer disease: a potential important subtype of familial Alzheimer disease. Arch Neurol2006;63(9):1307–1311. [PubMed: 16966510]

10. Bird TD. Genetic aspects of Alzheimer disease. *Genet Med* 2008;10(4):231–239. [PubMed:18414205]
11. Chai CK. The genetics of Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 2007;22(1):37–
12. Daw EW, Payami H, Nemens EJ, et al. The number of trait loci late-onset Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 2000;66(1):196–204. [PubMed: 10631151]
13. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 1987;325(6106):733–736. [PubMed: 2881207]
14. Sherrington R, Froelich S, Sorbi S, et al. Alzheimer's disease associated with mutations in presenilin 2 is rare and variably penetrant. *Hum Mol Genet* 1996;5(7):985–988. [PubMed 8817335]
15. Janssen JC, Beck JA, Campbell TA, et al. Early onset familial Alzheimer's disease: mutation frequency in 31 families. *Neurology* 2003;60(2):235–239. [PubMed: 12552037]
16. Raux G, Guyant-Marechal L, Martin C, et al. Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J Med Genet* 2005;42(10):793–795. [PubMed: 16033913]
17. Esler WP, Wolfe MS. A portrait of Alzheimer secretases—new features and familiar faces. *Science* 2001;293(5534):1449–1454. [PubMed: 11520976]
18. Higgins GA, Jacobsen H. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease: phenotype and application. *Behav Pharmacol* 2003;14(5–6):419–438. [PubMed: 14501255]
19. Mineur YS, McLoughlin D, Crusio WE, Sluyter F, Huynh LX. Genetic mouse models of Alzheimer's disease Social behavior deficits in the Fmr1 mutant mouse Genetic dissection of learning and memory in mice. *Neural Plast* 2005;12(4):299–310. [PubMed: 16444901]
20. Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil

- abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56(9):965–973. [PubMed: 9291938]
21. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature* 1991;349(6311):704–706. [PubMed: 1671712]
22. De Strooper B, Saftig P, Craessaerts K, et al. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* 1998;391(6665):387–390. [PubMed: 9450754]
23. Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 1999;398(6727):513–517. [PubMed: 10206644]
24. Theuns J, Del-Favero J, Dermaut B, et al. Genetic variability in the regulatory region of presenilin 1 associated with risk for Alzheimer's disease and variable expression. *Hum Mol Genet* 2000;9(3): 325–331. [PubMed: 10655540]
25. Wolfe MS, De Los Angeles J, Miller DD, Xia W, Selkoe DJ. Are presenilins intramembrane-cleaving proteases? Implications for the molecular mechanism of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1999;38(35):11223–11230. [PubMed: 10471271]
26. Baulac S, LaVoie MJ, Kimberly WT. Functional gamma-secretase complex assembly in Golgi/ trans-Golgi network: interactions among presenilin, nicastrin, Aph1, Pen-2, and gamma-secretase substrates. *Neurobiol Dis* 2003;14(2):194–204. [PubMed: 14572442]
27. Moehlmann T, Winkler E, Xia X, et al. Presenilin-1 mutations of leucine 166 equally affect the generation of the Notch and APP intracellular domains independent of their effect on Abeta 42 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(12):8025–8030. [PubMed: 12048239]
28. Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 1995;376(6543):775–778. [PubMed: 7651536]

29. Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, et al. A familial Alzheimer's disease locus on chromosome Science 1995;269(5226):970–973. [PubMed: 7638621]
30. Lindquist SG, Hasholt L, Bahl JM, et al. A novel presenilin 2 mutation (V393M) in early-onset dementia with profound language impairment. Eur J Neurol 2008;15(10):1135–1139. [PubMed: 18727676]
31. http://www.medic.ula.ve/idic/docs/clases/complementarioll_tema10.pdf
32. http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/6445/mod_resource/content/1/TP_qPCR_Bioinf_Bioq_2012.pdf
33. Takashi Mori,^{a,b,1} Kavon Rezai-Zadeh,^c Naoki Koyama,^a Gary W. Arendash,^{d,e} Haruyasu Yamaguchi,^f Nobuto Kakuda,^g Yuko Horikoshi-Sakuraba,^g Jun Tan,^{h,i} and Terrence Town Tannic Acid Is a Natural β -Secretase Inhibitor That Prevents Cognitive Impairment and Mitigates Alzheimer-like Pathology in Transgenic Mice Published online 2012 Jan 4. doi: 10.1074/jbc.M111.294025
34. Norio Sasaoka,¹ Megumi Sakamoto,¹ Shoko Kanemori,¹ Michiru Kan,¹ Chihiro Tsukano,² Yoshiji Takemoto,² and Akira Kakizuka **Long-Term Oral Administration of Hop Flower Extracts Mitigates Alzheimer Phenotypes in Mice** PLoS One. 2014; 9(1): e87185.
35. Meng F., Abedini A., Plesner A., Verchere C. B., Raleigh D. P. (2010) The flavanol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits amyloid formation by islet amyloid polypeptide, disaggregates amyloid fibrils, and protects cultured cells against IAPP-induced toxicity. Biochemistry 49, 8127–8133 [PMC free article] [PubMed]
36. Greeve I, Kretschmar D, Tschäpe JA, Beyn A, Brellinger C, Schweizer M, Nitsch RM, Reifegerste R.-Edad dependiente de la neurodegeneración y el Alzheimer amiloide formación de placa en transgénicos Drosophila J Neurosci 2004; 24:.. 3.899 a 3.906. doi:. 10.1523 / JNEUROSCI.0283-04.2004 [PubMed]
37. Chakraborty R, Vepuri V, Mhatre SD, Paddock SER, Miller S, Michelson SJ, Delvadia R, Desai A, Vinokur M, Melicharek DJ, Utreja S, Khandelwal P, S Ansaloni, Goldstein LE, Moir RD, Lee JC, Tabb LP , Saunders AJ,

- Marenda DR. Caracterización de un modelo de la enfermedad de Alzheimer Drosophila:.. De rescate farmacológico de defectos cognitivos PLoS One 2011; 6 (6): e20799. doi:. 10.1371 / journal.pone.0020799 [PMC libres artículo] [PubMed] [Cruz Ref]
38. Xue Wang¹, Jun-Ran Kim², Seong-Baek Lee³, Young-Joon Kim⁴, Moon Young Jung², Hyung-Wook Kwon^{2*} and Young-Joon Ahn² Effects of curcuminoids identified in rhizomes of *Curcuma longa* on BACE-1 inhibitory and behavioral activity and lifespan of Alzheimer's disease *Drosophila* models
39. Pirooznia SK, Sarthi J, Johnson AA, Toth MS, Chiu K, Koduri S, Elefant F: Tip60 HAT Activity Mediates APP Induced Lethality and Apoptotic Cell Death in the CNS of a *Drosophila* Alzheimer's Disease Model. PLoS One 2012, 7(7):e41776.
40. Kwak YD, Wang R, Li JJ, Zhang YW, Xu H, Liao FF: Differential regulation of BACE1 expression by oxidative and nitrosative signals. Mol Neurodegener 2011, 6:17.
41. **Alvarez Salazar Evelyn katy producción de mrna para citoquinas hematopoyéticas (il-3, gm-csf e il-7) en ratones inmunosuprimidos tratados con extracto acuoso de *lepidium meyenii* walpers (maca)**
42. Gonzales Daga José Manuel **Evaluación de la expresión de Ccna1, Cyp17, StAR y Prm2 en la espermatogénesis de ratones Swiss Rockefeller tratados con *Lepidium meyenii* Walp. (maca)**
43. Flores, S.E.; Walker, T.S.; Guimarães, R.L.; Vivanco, J.M. "Raíces y tubérculos andinos." Hortiscience. 2003, v.38, n. 2, p. 161-167.
44. Gonzales, G.F.; Gasco, M.; Córdava, A; Chung, A.; Rubio, J.L. "Effect of *Lepidium meyenii* (maca) on spermatogenesis in male rats acutely exposed to high altitude (4340 m)", Journal of Endocrinology. 2004, v. 180, n. 1, p. 87–95.
45. Bustos-Obregón, E.; Yucra, S.; Gonzales G.F. "*Lepidium meyenii* (maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice", Asian Journal of Andrology. 2005. v. 7, n.1, p. 71–76.
46. Chung, F.; Rubio, J.; Gonzales, C.; Gasco, M.; Gonzales, G.F. "Dose–response effects of *Lepidium meyenii* (maca) aqueous extract on

- testicular function and weight of different organs in adult rats". *Journal of Ethnopharmacology*. 2005. v. 98, p. 143–147.
47. Yucra, S.; Gasco, M.; Rubio, J.; Nieto, J.; Gonzales, G.F. "Effect of different fractions from hydroalcoholic extract of Black Maca (*Lepidium meyenii*) on testicular function in adult male rats." *Fertil Steril*. 2008; v.89, s.5, p.1461-7.
48. Zenico, T.; Cicero, A.F.; Valmorri, L.; Mercuriali, M.; Bercovich, E. "Subjective effects of *Lepidium meyenii* (Maca) extract on well-being and sexual performances in patients with mild erectile dysfunction: a randomised, double-blind clinical trial." *Andrologia*. v.41, s.2, p.95-9, 2009.
49. Brooks, N.A.; Wilcox, G.; Walker, K.Z.; Ashton, J.F.; Cox, M.B.; Stojanovska, L. "Beneficial effects of *Lepidium meyenii* (Maca) on psychological symptoms and measures of sexual dysfunction in postmenopausal women are not related to estrogen or androgen content". *Menopause*. 2008. v.15, s.6, p.1157-62.
50. Valentova, K.; Buckiova, D.; Kren, V.; Peknicova, J.; Ulrichova, J.; Simanek, V. "The in-vitro biological activity of *Lepidium meyenii* extracts." *Cell Biol Toxicol*. 2006. v.22, s.2, p.91-9.
51. Gonzales, C.; Rubio, J.; Gasco, M.; Nieto, J.; Yucra, S.; Gonzales, G.F. "Effect of short-term and long-term treatments with three ecotypes of *Lepidium meyenii* (MACA) on spermatogenesis in rats." *Journal of Ethnopharmacology*. 2006. v. 103, p. 448–454.
52. Gonzales, G.F.; Gasco, M.; Malheiros-Pereira, A.; Gonzales-Castañeda, C. "Antagonistic effect of *Lepidium meyenii* (red maca) on prostatic hyperplasia in adult mice". *Andrología*. 2008. v.40, s.3, p.179-85.
53. Gonzales, G.F.; Miranda, S.; Nieto, J.; Fernández, G.; Yucra, S.; Rubio, J. et al. "Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats." *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2005. v.3, n.1, p. 5.
54. López-Fando, A.; Gómez-Serranillos, M.P.; Lock, I.O.; Upamayt, U.P.; Carretero, M.E. "*Lepidium peruvianum* chacon restores homeostasis impaired by restraint stress." *Phytotherapy Research*. 2004. v. 18, p. 471–474.

55. Rubio, J.; Dang, H.; Gong, M.; Liu, X.; Chen SL, Gonzales GF. "Aqueous and hydroalcoholic extracts of black Maca (*Lepidium meyenii*) improve scopolamine-induced memory impairment in mice." *Food Chem Toxicol.* 2007 Oct;45(10):1882-90.
56. Rubio, J.; Qiong, W.; Liu, X.; Jiang, Z.; Dang, H.; Chen, S.L.; Gonzales, G.F. "Aqueous extract of black Maca (*Lepidium meyenii*) on memory impairment induced by ovariectomy in mice." *Evid Based Complement Alternat Med.* Oct 9 2008.
57. Wang, Y.; Mcneil, B; Harvey, L.M. "Maca: an Andean crop with multi-pharmacological functions." *Food Res Int.* 2007. v. 40, p. 783-792.
58. Zheng, B.L.; He, K.; Kim, C.H.; Rogers, L.; Shao, Y.; Huang, Z.Y.; Lu, Y.; Yan, S.J.; Qien L.C.; Zheng, Q.Y. "Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats." *Urology.* 2000. v. 55, n. 4, p. 598–602.
59. Li, G.; Ammermann, U.; Quirós, C.F. "Glucosinolate contents in maca (*Lepidium peruvianum* Chacón) seeds, sprouts, mature plants and several derived commercial products" *Econ. Bot.* 2001. v. 55, p. 225–262

ANEXO N° 2 PROTOCOLO PARA EL CULTIVO DE CELULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

1. Descongelación de células SH-SY5Y

- Sacar con cuidado “la tapa” de la pajilla del tanque de nitrógeno
- Incubar el eppendorf a 37°C por 2 minutos (ya sea en la incubadora o a mano, no es recomendable demorar más de 3 minutos, ya que el Dimetil sulfóxido (DMSO) es tóxico para las células)

2. Procedimiento de cultivo

- A un tubo de centrifuga estéril, agregar 1mL de DMEM + F12 Ham completo
- Traspasar el contenido del criopreservador al tubo preparado anteriormente
- Añadir 2mL más de DMEM + F12 Ham completo
- Centrifugar a 1000rpm por 5 minutos (hasta la obtención del pellet)
- Eliminar el sobrenadante
- Agregar 500µL de DMEM + F12 Ham completo
- Sacar una alícuota de 100µL para sembrarla en el Flask
- Agregar 4mL de DMEM + F12 Ham completo
- Incubar a 37°C con 5.0% de CO₂

ANEXO N° 3 PROTOCOLO PARA LA CRIOPRESERVACIÓN DE CELULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y

1. Preparación del medio de congelación

- Un día anterior, se prepara el medio de congelación; que consta de DMEM completo 700 μ L con 75 μ L de DMSO (almacenado a 4°C) y 300 μ L de Suero Fetal Bovino (SFB)
- Preparar DMEM completo (SFB 10% y 1X antibiótico)
- Adquirir hielo seco

2. Procedimiento de tripsinación

- Extraer el medio contenido en los flasks con 90% de confluencia
- Lavar con 3 - 4 mL de buffer fosfato salino (PBS) y/o DMEM incompleto es decir sin Suero Fetal Bovino (SFB), ni antibióticos, esto con el objetivo de eliminar la presencia de SFB el cual inhibe a la tripsina.
- Eliminar.
- Agregar a cada flask 1.5 mL de Tripsina – EDTA (temperatura ambiente). Y llevar a la incubadora a 37°C por 2 minutos, agitar suavemente y nuevamente colocarlo en la incubadora por 2 minutos (dejar máximo 5 minutos las células en contacto con la tripsina) evaluar el despegue de celular.
- Inactivar la acción de la enzima con 1.0 mL de SFB.
- Colocar la suspensión de células en un tubo centrífuga y agregar 2 mL de DMEM completo compuesto de DMEM, SFB 10% y 1X antibiótico.
- Centrifugar a 1000rpm por 5 minutos (hasta la obtención del pellet)
- Eliminar el sobrenadante
- Agregar 500 μ L de DMEM completo al pellet de células obtenido y resuspender.
- Añadir el medio de congelación helado
- Llevar rápidamente a -20°C por 2 horas
- Cambiar de temperatura a -80°C por 8 horas (hielo seco)
- Llevar al tanque de nitrógeno

ANEXO N° 4 : PROTOCOLO PARA LA OBTENCION DEL EXTRACTO PENTANICO

- Para la preparación de este extracto se trabaja con la maca secada a temperatura ambiente.
- Para el proceso de pulverizado se empleó un equipo de molienda
- Se utilizados dos equipos de soxleth para obtener un primer extracto metanólico
- Los parámetros establecidos en el equipo A fueron :

Parámetros	Número de extracciones				
	1	2	3	4	5
Cantidad de maca pesada (g)	66	66.04	66.02	66	66.045
Volumen de metanol utilizado (ml)	150	150	150	150	150
Temperatura empleada (C°)	55	55	55	55	55
Horas empleadas en la extracción (horas)	9	9	9	9	9

- Para la obtención del extracto pentánico se utilizó un equipo de extracción líquido- líquido diseñado por los investigadores.
- Se emplearon el total de extractos metanólicos preparados tanto por el equipo A
- El total de extractos metanolicos fueron concentrados a 500 ml y se le adicionó 500 ml de agua destilada
- Los parámetros establecidos para el equipo de extracción líquido-líquido fueron
- Volumen de extracto metanólico-acuoso : 1000 ml
- Volumen de pentano utilizado : 250 ml
- Evaporar el pentano hasta obtener un peso constante

**ANEXO N° 5 : DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LAS
DISTINTAS VARIEDADES DE MACA**

Concentraciones de los extractos pentánicos	Porcentaje de las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)								
	Maca Negra			Maca Roja			Maca Amarilla		
	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3
Control	3.2	2.26	2.76	3.54	3.66	3.6	1.26	3.14	2.2
0.5 ppm	2.17	1.5	1.83	1.4	1.22	0.86	1.4	2.34	1.87
1 ppm	1.34	2.2	1.67	1.06	2.94	2	1.86	2.14	2.5
10 ppm	2.54	1.14	1.84	3.34	2.34	2.84	2.8	2.86	2.83
25 ppm	1.84	2.26	1.4	1.86	3	2.63	2.46	2.86	2.66
50 ppm	2.66	2.34	2.5	4.2	4.74	4.47	4.34	5.06	4.7

**ANEXO N° 6: DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A LA
MACAMIDA SINTÉTICA N-BENCILOCTADECANAMIDA**

Concentraciones de N-benciloctadienildecanamida	Porcentaje de las Especies Reactivas de Oxígeno		
	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3
CONTROL	1.86	2.02	1.95
0.05 uM	3.54	2.66	2.54
0.1 uM	3.2	3.74	3.87
0.5 uM	3.16	2.78	2.64
1 uM	2.94	2.86	2.41
10 uM	2.86	2.4	2.66

**ANEXO N° 7 : DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS A
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO**

Concentraciones de peroxido de hidrogeno	Porcentajes de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)								
	30 minutos			1 hora			2 horas		
	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3
Control	2.06	3	2.61	1.11	2.8	2.6	2.49	2.55	3
25 uM	2.89	2.4	2.73	4.59	5.91	5.4	3.19	4.1	3.43
50 uM	2.35	3.99	2.81	5.91	6.9	5.8	3.8	4.19	4.89
100 uM	4.2	3.96	4.33	10.34	11.01	11.79	7.11	6.81	5.34

**ANEXO N° 8: DETERMINACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN CÉLULAS EXPUESTAS AL
PÉPTIDO β AMILOIDE**

Concentraciones de péptido β amiloide	Porcentajes de Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)								
	30 minutos			1 hora			2 horas		
	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3
Control	3	2.65	2.85	2.61	3.01	2.72	3.6	3	3.57
0.1 uM	4.37	4.88	4.76	4.68	5.2	5.025	5.91	5.55	5.23
0.5 uM	5.71	5.4	5.82	6.3	5.49	5.23	5.78	6.03	5.54
1 uM	8.3	8.32	7.48	8.7	8.38	7.81	6.21	7.07	7.07
5 uM	3.69	3.58	4.02	6.34	6.91	6.37	4.81	4.5	4.84
10 uM	4.29	5.7	4.02	7.21	6.81	7.63	4.89	5.4	4.62

ANEXO N° 9: EVALUACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENOS EN CELULAS PRETRATADAS CON EXTRACTO DE MACA Y PEPTIDO β AMILOIDE

Grupos Experimentales	PORCENTAJES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (EROs)								
	Maca Negra			Maca Roja			Maca Amarilla		
	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3
Control	2.34	1.86	2	1.54	1.86	1.95	2.07	2.14	1.78
Control DMSO	5.55	6.32	5.83	5.74	6.33	5.43	6	5.54	5.34
Control DMSO BETA	9.01	8.34	8.67	9.24	8.3	9.71	10.2	8.97	9.51
0.5 ppm	4.32	5.15	5.23	8.21	7.6	7.16	7.49	8	7.23
10.ppm	7.15	7.86	8.61	8.6	9.96	10.4	9.18	9.24	8.81
50 ppm	8.11	7.95	9.13	9.2	11.32	10	11.42	10.34	9.86

ANEXO N° 10: EVALUACION DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENOS EN CELULAS PRETRATADAS CON LA MACAMIDA SINTETICA N-BENCILOCTADIENILDECANAMIDA Y PEPTIDO β AMILOIDE

Concentraciones de N-benciloctadienildecanamida	Porcentaje de las Especies Reactivas de Oxígeno		
	Muestra N° 1	Muestra N° 2	Muestra N° 3
CONTROL	1.86	2.02	1.95
0.05 μM	3.54	2.66	2.54
0.1 μM	3.2	3.74	3.87
0.5 μM	3.16	2.78	2.64
1 μM	2.94	2.86	2.41
10 μM	2.86	2.4	2.66