

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Bioquímica y Biología Molecular



**“EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE TRES ECOTIPOS DE *Lepidium meyenii* (MACA)
Y N-BENCILOCTADECADIENAMIDA EN LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE PSEN1,
BACE1 Y APP EN CÉLULAS *in vitro* DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y”**

Tesis presentada por el Bachiller:
Carpio Carpio, José Miguel

Para optar el Grado Académico de:
Maestro en Bioquímica y Biología Molecular

Asesor: PhD. Villanueva Salas José

Arequipa – Perú

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, 09 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 450003

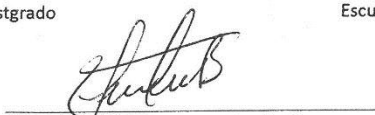
De mi consideración,

Me es grato dirigirme a Ud. con el fin de saludarlo atentamente y en atención al nombramiento como DICTAMINADOR del Borrador de Tesis titulado **“EFECTOS DE LOS EXTRACTOS DE 03 ECOTIPOS DE LEPIDIUM MEYENII (MACA) Y N-BENCIL OCTADECANAMIDA (M75) EN LA EXPRESION GENETICA DE PSEN1, BACE1 Y APP EN CELULAS IN VITRO DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y”** con el que el bachiller **Jose Miguel Carpio Carpio**, 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

ESTE TRABAJO DE TESIS ESTA DEDICADO CON MUCHO AMOR Y AFECTO A:

El Señor de los Milagros, por ser mi roca, fortaleza y la luz en mi camino, eres Paz siempre en la tempestad...GRACIAS!!!

A mama Raquel y mama Olga, aunque ya no están a mi lado, sé que guían mis pasos. Las recuerdo y pienso cada momento.

A mis padres Nilda y Wilber, por su amor y paciencia inagotable, por sus sacrificios y consejos gracias por hacer de mi cada día una persona de bien, los AMO!!!

A mi hna Rocío, por su cariño y empuje estas presente en mis pensamientos, de ser mi pequeña.

siempre nunca dejaras

AGRADECIMIENTOS

Al FONDECYT, por permitir el financiamiento de este trabajo de tesis.

Eterno agradecimiento al Dr. JOSE VILLANUEVA SALAS., por su invaluable consejo y ayuda en lo personal, profesional y en la vida diaria.

Al Dr. Alejandro Pino Figueroa y al MCPHS por su apoyo y colaboración desinteresada este trabajo.

en

A mis jurados de tesis, Dr. José Villanueva S, Dr. Julio C. Bernabe O y Dr. Hugo Tejada P., por su tiempo y consejos brindados.

Al Laboratorio de Biología Molecular y Farmacología Experimental de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la UCSM de Arequipa, mi casa, por permitir la realización y finalización este trabajo.

de

A mis amigas de la Maestría y colegas, Julitza, Mocita y Karin, empezamos una idea y un sueño que ya es una realidad, espero que sigamos soñando, mucha suerte en sus proyectos profesionales.

A Alexa y Carla, tesisistas del Laboratorio de Molecular y Farmacología Experimental, casi Ingenieras Biotecnológicas, por su amistad desinteresada siempre las recordare tiempo

*Biología
ya
y a
gracias por*

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	xvi
OBJETIVOS	xviii
HIPOTESIS	xix
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	1
1. Lepidium meyenii	1
1.1. DISTRIBUCIÓN.	2
1.2. ECOLOGÍA Y POSIBLES ÁREAS PARA EL CULTIVO.	3
1.3. CONSTITUYENTES QUÍMICOS	4
1.4. VARIEDADES DE MACA	9
2. GENOMAS	10
2.1. GENOMA EUCARIOTA	10
2.2. GENES	11
2.3. LA EXPRESION GENICA	12
2.3.1. ¿Cómo se expresan los genes?	13
2.3.2. 2.3.2 El proceso de Transcripción	14
2.3.3. ¿Cómo se traduce el mensaje genético?	15
3. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERSA EN TIEMPO REAL (qPCR)	16
3.1. Pasos de la PCR en tiempo real	18
3.2. QRT-PCR de dos pasos	18
3.3. QRT-PCR de un paso	19
3.4. Descripción general de los componentes de PCR en tiempo real	19
3.5. Tecnología de análisis de PCR en tiempo real	21
3.6. Sistemas de detección de fluorescencia de PCR en tiempo real	26
4. GENES IMPLICADOS EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	29
4.1. Proteína Precursora de Amiloide (APP)	29

4.2. β -Secretasa	32
4.3. Presenilinas	33
5. PEPTIDO BETA AMILOIDE ($A\beta$)	34
6. CULTIVOS CELULARES	36
6.1. ESTADOS DEL CULTIVO CELULAR	37
7. CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y	38
CAPITULO II	39
1. MATERIALES Y METODOS	39
1.1. UBICACIÓN GEOGRAFICA DEL ESTUDIO	39
2. EXTRACTOS DE MACA	39
3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	39
3.1. Material Biológico	39
3.2. Materiales de Laboratorio	39
3.3. Equipos	41
3.4. Reactivos	41
3.5. Kits	42
4. METODOLOGIA	42
4.1. Preparación de medio de cultivo celular Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)	42
4.2. Cultivo de Células de Neuroblastoma	43
4.3. Conteo y Viabilidad de las Células SH-SY5Y de neuroblastoma humano	44
4.4. Preparación de las Muestras de Maca	45
4.5. Exposición de las Células de Neuroblastoma SH-SY5Y al Péptido β -Amiloide y Expresión Genética de APP, BACE1 y PSEN1.	46
4.6. Extracción de ARN total a partir de células de neuroblastoma humano, expuestas a 05 concentraciones diferentes de β -Amiloide	46
4.7. Evaluación de la integridad y calidad del ARN de células SH-SY5Y	47
4.8. Cuantificación de la concentración de ARN total de células SH-SY5Y.	47
4.9. Síntesis de ADN complementario (ADNc)	48
4.10. Cuantificación del ADNc obtenido por fluorometría.	49
4.11. Medición de la expresión relativa de los genes APP, PSEN1 y BACE1 por qPCR	49
4.12. Exposición de las Células de Neuroblastoma SH-SY5Y a <i>Lepidium meyeri</i>	55

4.13.	Medición de la expresión relativa de los genes APP, PSEN1 y BACE1 por qPCR	56
4.14.	Efecto Neuroprotector de 3 Ecotipos de Maca (Amarilla, Negra y Roja) en células de Neuroblastoma SH-SY5Y estresadas con el péptido β -Amiloide	58
4.14.1.	Preparación de muestras para evaluar el efecto neuroprotector de 3 ecotipos de maca sobre células de neuroblastoma humano expuestas al péptido β -Amiloide (0.5uM)	58
4.15.	Preparación de 3 ecotipos de maca sobre células de neuroblastoma humano como Co-Tratamientos expuestas al péptido β -Amiloide (0.5uM)	59
4.16.	Extracción del ARN total, cuantificación de la concentración, calidad e integridad del material genético, síntesis del ADNc y medición de la expresión genética de APP, BACE1 y PSEN1 en células de neuroblastoma humano.	60
4.17.	Efecto Neuroprotector de N benciloctadecadienamida en células de Neuroblastoma SH-SY5Y estresadas con el péptido β -Amiloide	60
4.17.1.	Acción de macamida sintética sobre células de neuroblastoma humano como Co-Tratamientos expuestas al péptido β -Amiloide (0.5uM)	61
4.18.	Extracción del ARN total, cuantificación de la concentración, calidad e integridad del material genético, síntesis del ADNc y medición de la expresión genética de APP, BACE1 y PSEN1 en células de neuroblastoma humano.	61
CAPITULO III		62
RESULTADOS Y DISCUSIONES		62
1.	Establecimiento del cultivo de células de neuroblastoma	62
2.	Extracción de ARN total a partir de células de neuroblastoma humano	63
3.	Cuantificación del ARN obtenido por fluorometría	65
4.	Síntesis de ADNc y cuantificación por fluorometría	65
5.	Medición de la expresión relativa de los genes APP, BACE1 y PSEN1	66
6.	Reporte de la expresión de los genes APP, BACE1 y PSEN1	68
7.	Resultados y Análisis de la Variación de la Expresión Génica de células SH-SY5Y con respecto a 3 ecotipos de maca.	70
8.	Resultados y Análisis de la Variación de la Expresión Génica de células SH-SY5Y administrando N – benciloctadecadienamida (M75).	72
9.	Resultados Estadísticos	73
CAPITULO IV CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS		95
CONCLUSIONES		95
SUGERENCIAS		97
BIBLIOGRAFIA		98

ANEXO 1	107
ANEXO 2	115
ANEXO 3	116
ANEXO 4	117
ANEXO 5	118
ANEXO 6	119
ANEXO 7	120
ANEXO 8	122
ANEXO 9	123
ANEXO 10	124



INDICE DE TABLAS

TABLA 1. AMINOÁCIDOS PRESENTES EN LEPIDIUM MEYENII.....	5
TABLA 2 MACAMIDAS PRESENTES EN LEPIDIUM MEYENII.....	8
TABLA 3. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES O CEBADORES UTILIZADOS PARA REALIZAR LA PCR TIEMPO REAL (QPCR) DE LOS GENES APP, PSEN1, BACE1 Y GEN DE REFERENCIA GAPDH.....	50
TABLA 4 PREPARACIÓN DEL MIX DE REACCIÓN PARA REALIZAR LA CUANTIFICACIÓN GENÉTICA DE APP POR QPCR.....	52
TABLA 5 PREPARACIÓN DEL MIX DE REACCIÓN PARA REALIZAR LA CUANTIFICACIÓN GENÉTICA DE PSEN1 POR QPCR.....	53
TABLA 6 PREPARACIÓN DEL MIX DE REACCIÓN PARA REALIZAR LA CUANTIFICACIÓN GENÉTICA DE BACE1 POR QPCR.....	53
TABLA 7 CONCENTRACIÓN FINAL DE LOS CEBADORES Y PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN PARA EL GEN APP Y EL GEN DE REFERENCIA GAPDH.....	54
TABLA 8 CONCENTRACIÓN FINAL DE LOS CEBADORES Y PROTOCOLO DE AMPLIFICACIÓN PARA EL GEN BACE1 Y EL GEN DE REFERENCIA GAPDH	54
TABLA 9 CONCENTRACIÓN FINAL DE LOS CEBADORES Y PROTOCOLO DE A MPLIFICACIÓN PARA EL GEN PSEN1 Y EL GEN DE REFERENCIA GAPDH	55
TABLA 10 MUESTRAS PREPARADAS CON CÉLULAS SH-SY5Y, B-AMILOIDE (SUM) Y 2 CONCENTRACIONES DE 3 ECOTIPOS DE MACA.	59
TABLA 11 ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL PARA LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE BACE1, APP Y PSEN1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A B-AMILOIDE	73
TABLA 12 COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A B-AMILOIDE.....	75
TABLA 13 ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN BACE1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A 03 ECOTIPOS MACA	77
TABLA 14 COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN BACE1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A MACA	78
TABLA 15 ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN APP EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A 03 ECOTIPOS DE MACA	79
TABLA 16 COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN APP EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y 03 ECOTIPOS DE MACA.....	81
TABLA 17 ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL PARA LA EXPRESIÓN DEL PSEN1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A 03 ECOTIPOS DE MACA	82
TABLA 18 COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN PSEN1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES Y TIPOS DE MACA.....	83
TABLA 19 ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN BACE1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO.....	84
TABLA 20 COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN BACE1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO Y SUSTANCIA	86
TABLA 21 ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN BACE1 EN CÉLULAS SH—SY5Y EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO	88
TABLA 22 ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN APP EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO	89
TABLA 23 COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN APP EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO Y SUSTANCIA	90
TABLA 24 ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIFACTORIAL PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN PSEN1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO.....	92

TABLA 25 COMPARACIONES MÚLTIPLES PARA LA EXPRESIÓN DEL GEN APP EN CÉLULA SH-SY5Y EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO Y SUSTANCIA..... 93



INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 ESTRUCTURA DE UN MACAENO Y SU CORRESPONDIENTE MACAMIDA	8
FIGURA 2 LEPIDIUM MEYENII	10
FIGURA 3 PROTEINA PRECURSORA DE AMILOIDE	30
FIGURA 4 TRAFICO INTRACELULAR DE APP	31
FIGURA 5 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL PROCESAMIENTO DE LA PROTEÍNA PRECURSORA AMILOIDE (APP)	35
FIGURA 6 CULTIVO CELULAR	37
FIGURA 7 REACTIVOS QUE COMPONEN EL MEDIO COMPLETO DMEM, SUERO FETAL BOVINO, TRIPSINA, ANTIBIÓTICO Y ANTIMICÓTICO	43
FIGURA 8 . CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS Y VIABILIDAD CELULAR	45
FIGURA 9 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE RNA	48
FIGURA 10 KIT PARA LA SINTESIS DE ADNC, ONESCRIP CDNA SYNTHESIS KIT (APPLIED BIOLOGICAL MATERIALS, ABM)	48
FIGURA 11 OLIGONUCLEÓTIDOS (PRIMERS) EMPLEADOS EN LA EXPRESIÓN GÉNICA, APP, PSEN1, BACE1 Y GAPDH	50
FIGURA 12 ° PREPARACIÓN DEL MIX PARA QPCR EN CABINA ESTÉRIL	51
FIGURA 13 COLORANTE FLUORESCENTE SYBRGREEN, EMPLEADO PARA CUANTIFICAR LA EXPRESIÓN GÉNICA DE APP, PSEN1 Y BACE1	57
FIGURA 14 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EVALUAR EXPRESIÓN, GÉNICA EMPLEANDO EL EQUIPO REALPLEX EPPENDORF.	57
FIGURA 15 CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LOS ARN EXTRAÍDOS DE VOLUNTARIOS CON EPILEPSIA. AGAROSA: 1%. CONDICIONES DE CORRIDA: 80V/30MIN.	64
FIGURA 16 CURVAS DE AMPLIFICACIÓN POR QPCR DE LOS GENES APP, PSEN1 Y BACE1	67
FIGURA 17 CURVAS DE DISOCIACIÓN DE LOS GENES PSEN1, BACE1 Y GAPDH	68
FIGURA 18 EXPRESIÓN GENÉTICA DE BACE1, APP Y PSEN1 EN CÉLULAS SH- SY5Y EXPUESTAS A B-AMILOIDE	74
FIGURA 19 EXPRESIÓN DEL GEN BACE1 EN CÉLULAS SH-SY5Y.EXPUESTAS A 03 ECOTIPOS TIPOS DE MACA	77
FIGURA 20 EXPRESIÓN DEL GEN APP EN CÉLULAS SH-SY5Y.EXPUESTAS A 03 ECOTIPOS DE MACA	80
FIGURA 21EXPRESIÓN DEL GEN PSEN1 EN CÉLULAS SH-SY5YEXPUESTAS A 03 ECOTIPOS MACA	82
FIGURA 22 EXPRESIÓN DEL GEN BACE1 EN CÉLULAS SH-SY5Y, EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO	85
FIGURA 23 EXPRESIÓN DEL GEN APP EN CÉLULAS SH-SY5Y, EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO	89

**FIGURA 24 EXPRESIÓN DEL GEN PSEN1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A
DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO**

92



RESUMEN

La formación de depósitos de placas de proteína C-amiloide ($A\beta$) en el cerebro, pueden evocar la muerte de las células neuronales y perjudicar la comunicación inter neuronal. La formación de dichas placas o simplemente el estrés generado por esta sustancia en las líneas celulares, puede desencadenar diferentes respuestas inmunitarias y moleculares por parte de nuestras células. Producción de Oxido Nítrico, Anion Superóxido y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) son respuesta inmunitaria de un organismo. Sin embargo, estas respuestas y otras están mediadas exclusivamente por nuestro material genético. La expresión genética se puede ver alterada cuando existe de por medio un agente estresante. En el presente estudio se ha analizado la expresión genética de APP, BACE1 y PSEN1 en células SH-SY5Y, cuando estas células son sometidas a estrés por β -Amiloide. Se cultivó 3×10^4 células /mL, dichas muestras fueron tripsinadas y luego recolectadas. Se empleó la técnica de TRIZOL-Alcohol Isoámilico para extraer ARN total, luego se procedió a medir su concentración e integridad, se realizó la síntesis de ADNc. En una cabina de seguridad para PCR se preparó los mix de reacción par qPCR y se procedió a cuantificar los genes APP, BACE1 y PSEN1. Estudios realizados nos sugieren que los 3 ecotipos de *Lepidium meyeri* (maca amarilla, negra y roja) , así como también N benciloctadecadienamida (M75) reducen los niveles de $A\beta$ en líneas celulares SH-SY5Y de neuroblastoma humano, reduciendo los niveles de sobre expresión génica de APP, PSEN1 y BACE1 inducidos por el péptido. El gen APP, disminuye su expresión 6.11 veces cuando se administra maca amarilla (0.5ug/mL) por 24 horas, así como 4.9 veces cuando se incuba por 24 horas con maca a 10ug/mL. EL gen BACE1 presenta mejor respuesta con maca negra, reduciendo 12.6 veces (0.5ug/mL) y 25.5 veces(10ug/mL), en cuanto al gen PSEN1 también la maca negra presentó mejor respuesta, reduciendo 125.9 veces (0.5ug/mL) y 22.3 veces(10ug/mL), incubando por 24 horas. EL ecotipo maca negra, en el gen APP tuvo una mejor respuesta a una concentración de 10ug/mL, reduciendo la expresión genética hasta en 46veces Para el gen BACE1 la concentración de 0.5ug/ml y 10ug/ml de maca negra tuvieron una respuesta similar reduciendo la expresión genética entre 53.9 y 42.2 veces. En cuanto al gen PSEN1 la maca negra también presentó mejores resultados, reduciendo 29.4 y 10.9 veces.

N- Benciloctadecadienamida (M75), empleado como Co-Tratamiento tiene un efecto positivo en la disminución de la expresión génica inducida por β -Amiloide, la respuesta de esta macamida sintética es muy parecida en cuanto a resultado cuando se trabaja incubando por 24 y 48 horas, las concentraciones empleadas de M75 (0.5 y 10ug/ml), presentan una respuesta muy parecida.

Palabras clave: *Lepidium meyenii*, N- Benciloctadecadienamida, células SH-SY5Y



ABSTRACT

The formation of C-amyloid protein ($A\beta$) deposits in the brain can evoke the death of neuronal cells and impair inter neuronal communication. The formation of said plates or simply the esters generated by this substance in the cell lines can trigger different immune and molecular responses by our cells. Production of Nitric Oxide, Anion Superoxide and other reactive oxygen species (ROS) are the immune response of an organism. However, these responses and others are mediated exclusively by our genetic material. The genetic expression can be altered when there is a stress agent involved. In the present study, we have analyzed the genetic expression of APP, BACE1, and PSEN1 in SH-SY5Y cells, when these cells are subjected to stress (β -Amyloid). 3×10^4 cells/ml were cultured, said samples were trypsinized and then harvested. The technique of TRIZOL-Isoamyl Alcohol was used to extract total RNA, then its quality and integrity were measured, cDNA synthesis was carried out. In a safety cabinet for PCR, the qPCR reaction mix was prepared and the APP, BACE1, and PSEN1 genes were quantified. Studies suggest that the 3 ecotypes of *Lepidium meyeri* (yellow, black and red maca), as well as also N-benzyl-octadecanamide (M75) reduce $A\beta$ levels in human neuroblastoma SH-SY5Y cell lines, reducing the levels of gene expression of APP, PSEN1, and BACE1 induced by the peptide. The APP gene decreases its expression 6.11 times when yellow maca (0.5mg / ml) is administered for 24 hours, as well as 4.9 times when incubated for 24 hours with maca at 10mg / ml. The BACE1 gene presented a better response with black maca, reducing 12.6 times (0.5mg / ml) and 25.5 times (10mg / ml). As for the PSEN1 gene, black maca also presented a better response, reducing 125.9 times (0.5mg / ml) and 22.3 times (10mg / ml), incubating for 24 hours. The black maca ecotype, in the APP gene, had a better response at a concentration of 10mg / ml, reducing gene expression up to 46 times for the BACE1 gene, the concentration of 0.5mg / ml and 10mg / ml of black maca had a similar response reducing gene expression between 53.9 and 42.2 times. As for the PSEN1 gene, the black maca also showed better results, reducing 29.4 and 10.9 times N-benzyl-octadecanamide (M75), used as Co-Treatment has a positive effect on the decrease of gene expression induced by β -Amyloid, the response of this synthetic maximize is very similar in terms of result when working incubating by 24 and 48 hours, the concentrations used of M75 (0.5 and 10mg / ml), present a very similar response

Keywords: *Lepidium meyeri*, N-benzyl-octadecanamide, SH-SY5Y cells

INTRODUCCIÓN

Las células como sistema biológico, cumplen diferentes roles, emitiendo señales moleculares, produciendo respuestas en diferentes órganos siendo de vital importancia para el desarrollo fisiológico correcto de un organismo. Dichas señales moleculares están claramente manejadas por los genes y su información genética. La buena regulación de estos y su armonía en todos los procesos vitales son de suma importancia, el desequilibrio y alteración que pueden sufrir los genes se ha regido por dos motivos principales, la herencia genética y los factores epigenéticos.

La herencia familiar arrastra por muchos años cambios en nuestro DNA, lo que conlleva a tener finalmente a las proteínas una mala información que desencadena una serie de sucesos moleculares que pueden tener mucha influencia en el buen desempeño de nuestras células.

El término epigenética por el contrario hace referencia al conjunto de elementos que regulan la expresión de los genes sin modificar la secuencia del ADN y hacen posible que los diferentes tipos de células y tejidos expresen unos genes y no otros, y además, lo hagan en el momento adecuado (Amparo Tolosa, Genética Médica News).

Las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, a menudo se usan como modelos in vitro de función y diferenciación neuronal. Son adrenérgicos en el fenotipo pero también expresan marcadores dopaminérgicos y, como tales, se han utilizado para estudiar la enfermedad de Parkinson, la neurogénesis y otras características de las células cerebrales.

Muchas enfermedades neurodegenerativas en nuestro país han cobrado gran importancia por el número de casos reportados y por las consecuencias que tiene en la familia y la sociedad. La enfermedad del Alzheimer (EA) por ejemplo, se caracteriza por la acumulación de agregados de proteínas patológicas en el cerebro. Se producen dos estructuras distintas: placas seniles que contienen beta amiloide ($A\beta$) y Tau hiperfosforilado que contiene ovillos neurofibrilares. Las Placas $A\beta$ se componen de un péptido derivado del precursor amiloide proteína (APP), una transmembrana expresada constitutivamente proteína que se encuentra en muchos tipos de células. Como parte de la fisiología normal de las neuronas, la APP se divide por una serie de secretasas, α -secretasa, β -secretasa (BACE), y γ -secretasa (Presenilin 1 y 2).

Estudios genéticos nos demuestran día a día que las alteraciones que sufren las células, entonces todos los sistemas organizados, son provocados por daños arrastrados de generación en generación, la llamada Herencia Familiar, pero también están de por medio los cambios Epigenéticos que pueden tener mayor relevancia. En las enfermedades neurodegenerativas no es la excepción, pues la sobre producción del A β en la enfermedad del Alzheimer finalmente desencadenara daños irreversibles en el sistema nervioso de los que la padecen. Esta sobreproducción de (A β), puede influir de manera significativa en el desarrollo de la enfermedad, activando de una manera irregular el funcionamiento de genes ya mencionados, acelerando posiblemente el daño neuronal o activando otras cascadas de señalización molecular que podrían influir en otras patologías.

En el presente trabajo se buscó evaluar el efecto Neuroprotector de tres eco tipos de *Lepidium meyenii* (Maca), en la expresión genética de PSEN1, BACE1 y APP en células in vitro de neuroblastoma humano SH-SY5Y. De esta forma, se determinará las respuestas celulares y moleculares en la expresión de dichos genes que podría tener *Lepidium meyenii* sobre el estrés que pueda ocasionar la proteína AB en las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar el efecto de los extractos de tres ecotipos de *Lepidium meyenii* (maca) y N-Benciloctadecadienamida (M75), en la expresión genética de PSEN1, BACE1 y APP en células *in vitro* de neuroblastoma humano SH-SY5Y.

Objetivos Específicos

- Cuantificar la expresión genética de los genes APP, BACE1 y PSEN1 de células *in vitro* SH-SY5Y tratadas con el péptido β -A.
- Cuantificar la expresión genética de los genes APP, BACE1 y PSEN1 de células *in vitro* SH-SY5Y tratadas con extractos pentánicos de tres ecotipos de maca (amarilla, negra y roja).
- Comparar la expresión genética de los genes APP, BACE1 y PSEN1 de células *in vitro* SH-SY5Y expuestas al péptido β -Amiloide, frente al tratamiento con tres ecotipos de maca (amarilla, negra y roja). y N-Benciloctadecadienamida (M75)

HIPOTESIS

- Dado que se atribuye a *Lepidium meyenii* diferentes propiedades biológicas, es probable que los extractos de maca y N – Benciloctadecadienamida (M75), inhiba o reduzca los cambios provocados por Beta Amiloide en la expresión genética en las células SH-SY5Y.

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

1. *Lepidium meyenii*

Lepidium pertenece a la familia Brassicaceae (Crucíferas) y es, con 150 a 175 especies, el género más grande de la familia (1,2). La especie más ampliamente distribuida es *Lepidium sativum* L. cuyas plántulas son comestibles. El género tiene una distribución mundial, con excepción de la Antártida, pero está restringido a regiones tropicales y subtropicales, mayoritariamente altas montañas. El género *Lepidium* tiene probablemente su origen en el área mediterránea, donde se encuentra la mayor parte de las especies diploides (3, 4). La revisión más reciente de las especies sudamericanas fue realizada por Hitchcock, quien reconoce 42 especies. *Lepidium* comprende principalmente hierbas anuales y perennes, así como subarbustos y pequeños arbustos. Morfológicamente se caracteriza por sus frutos dehiscentes (silículas provistas de un tabique angosto), con el ápice normalmente emarginado, con valvas fuertemente cuneiformes; semillas péndulas con una testa muy mucilaginosa, dos o cuatro (a veces seis) estambres, y nectarios cónicos (5, 6). En total se reconocen 14 especies presentes en Perú, incluyendo *L. meyenii* y *L. peruvianum*. Al menos seis especies silvestres, además de *L. meyenii*, han sido reportadas para el centro de Perú. Aunque algunas de estas especies silvestres ocurren en simpatría con *L. meyenii*, no se sabe cuáles serían sus parientes más cercanos. Un estudio molecular (RFLP, RAPD), con muestras de diferentes procedencias, de tres especies silvestres (*L. bipinnatifidum*, *L. kalenbornii* y *L. chichicara*) no encontró suficientes similitudes de estas especies silvestres con las formas cultivadas de *L. meyenii*. Nada o muy poco se sabe acerca del origen de la maca.

Morfología:

L. meyenii es una planta bienal, raramente anual, con órgano reservante subterráneo y tallos decumbentes (7). Los tallos están escasamente ramificados, los ejes 3—10(—20) cm de largo y provistos de una roseta basal. Las hojas son claramente dimorfas, las hojas de la roseta son más grandes, 3—8 cm de largo, carnosas, pinnatífidas hasta bipinnatisectas y frecuentemente, más o menos liradas. Las hojas caulinares en los botones florales son reducidas, enteras, lobadas o profundamente crenadas. Las inflorescencias son panículas

(racimos compuestos), paucifloras, 1—2(—5) cm de largo y frecuentemente en parte cubiertas de hojas. Para *L. meyenii* se indica que posee dos estambres con anteras amarillentas de dehiscencia longitudinal y cuatro nectarios verdosos, ubicados en la base del ovario, dos a cada lado de los estambres (8). Los frutos son silículas, 4—5 mm de largo, dehiscentes, con dos cavidades cuneadas, cada una de las cuales contiene una semilla. Las semillas son aovadas, 2—2,5 mm de largo, de color rojo grisáceo. El órgano reservante es de 2—5 cm largo y es un poco difícil afirmar si es un tallo (hipocótilo) o raíz sin haber estudiado la ontogenia de la planta; aunque es muy probable que la región de transición entre el tallo y la raíz asumiría la mayor parte de engrosamiento del órgano de reserva. Este órgano corresponde a la parte comestible de la planta y puede ser blanco, amarillento o rosado y hasta rojo.

Taxonomía. Dos nombres científicos diferentes son empleados para la maca, cuya validez y prioridad no es clara. El nombre más antiguo es *Lepidium meyenii* Walp. (9). La descripción original se basa en un espécimen (holotipo) que fue colectado en Perú, departamento de Puno, cerca de Pisacoma, a una altitud cercana a los 5.000 m. Chacón, en un estudio tan amplio como poco claro, separa la forma cultivada, *Lepidium peruvianum* G. Chacón de Popovici, de la especie silvestre comestible *L. Meyenii* (8). Si bien el catálogo de la flora de Perú menciona ambos nombres, el nombre *L. peruvianum* es escasamente reconocido por otras fuentes y no se encontraba, hasta hace muy poco, por ejemplo, en el The International Plant Names Index (). No existe una revisión crítica más reciente del género *Lepidium* en los Andes sudamericanos y las definiciones actuales se refieren en gran medida a Macbride y Hitchcock (9). Los trabajos más

1.1. DISTRIBUCIÓN.

L. meyenii se distribuye en los Andes centrales de Perú, Bolivia y noroeste de Argentina. En Perú esta especie tiene hoy en día un área limitada de distribución y cultivo. Está casi restringida a los departamentos de Junín y Pasco. Las áreas de cultivo de mayor extensión se encuentran en los alrededores del lago Junín, cerca de Huayre, Carhuamayo, Uco, Ondores, Junín, Ninacaca y Vicco. Posibles ocurrencias de poblaciones silvestres (o de poblaciones asilvestradas) se han señalado para las montañas de Ichuasi en Puno y para los sectores de Torata y Carumas en Moquegua. Se

asume que el cultivo de la maca ya estaba ampliamente repartido en Perú en los siglos XVI y XVII. Probablemente la maca fue cultivada más tempranamente, al menos en Cusco y en la cuenca del lago Titicaca.

1.2. ECOLOGÍA Y POSIBLES ÁREAS PARA EL CULTIVO.

Hábitat. El cultivo de la maca se restringe a los territorios no arbolados de la vegetación de la puna, entre los (3.700—4.000—4.500 m. Estas zonas de vegetación corresponden a áreas esteparias, relativamente infértiles de los pisos altoandinos, que se caracterizan por fuertes vientos, alta radiación solar y bajas temperaturas. Las temperaturas pueden llegar a -10°C (26). La temperatura media diaria es de 18°C , la temperatura media nocturna 8°C y la humedad relativa del aire promedio de 70%. La especie es, entre las especies vegetales útiles, una de las más tolerantes a las heladas y prospera incluso en área de altitud, donde sólo algunas otras gramíneas alto andinas pueden crecer. Los suelos del área de cultivo son normalmente ácidos, con $\text{pH} < 5$. Crecimiento. La maca es normalmente bienal. El primer período de crecimiento finaliza con el desarrollo de una roseta foliar basal visible y del órgano reservante, y dura casi siete meses (9). En el segundo año se forman los tallos florales, primero formándose unas pocas flores en el centro de la roseta basal y otras aisladas en las axilas foliares, las que, sin embargo, forman muy pocos frutos. Simultáneamente, en la base de la planta y debajo de las hojas, se forman brotes generativos con flores reproductivas y formación de frutos. Dentro de los siguientes tres meses se forman, en los brotes generativos secundarios, racimos con 50-70 flores. La maca es principalmente auto polinizada (autógama) y cleistógama, aunque también se indica que durante su estado reproductivo presenta un largo periodo de floración y apertura de flores en series sucesivas (10). Los frutos se forman dentro de un período de cinco semanas y luego comienzan a dispersarse las semillas. El fructificación tiene éxito en cerca de 85%. Una planta individual de maca produce hasta 14 gr de semillas ($\text{P1000} \approx 0,625 \text{ g}$). Las semillas germinan sin latencia bajo condiciones húmedas, a 25°C después de alrededor de una semana; sin embargo, bajo buenas condiciones climáticas (humedad suficiente, pocas heladas, temperaturas óptimas bajas), puede desarrollarse como una planta anual y completa todo el ciclo de vida en un año. En condiciones de laboratorio la maca completa el ciclo de vida en 11 meses.

Fotoperiodo. Ensayos de cultivo en Estados Unidos han mostrado que la maca también puede ser cultivada exitosamente en invierno en California (11). Podría ser igualmente mostrado que el fotoperiodo no tiene influencia en el crecimiento y desarrollo, y que la especie no necesita días cortos para el desarrollo del nabo y de las flores y por lo tanto es considerada neutral frente al fotoperiodo. Región de cultivo. Debido a los bajos requerimientos térmicos, pero relativamente altas exigencias en la calidad del suelo (nutrientes, humedad), su cultivo es probablemente posible en gran parte de la alta cordillera de Perú. En los departamentos del norte (Cajamarca, Piura, Tumbes, San Martín, Lambayeque y Amazonas) faltan, sin embargo, grandes extensiones de tierras altas. Particularmente adecuadas parecen ser las partes alto andinas de los departamentos La Libertad, Ancash, Junín, Huánuco, Apurímac, Ayacucho, así como de Cusco y de la parte oriental de Puno. Las zonas occidentales de los departamentos Apurímac y Ayacucho, así como de Puno serían, excepto en zonas bajas húmedas, demasiado secas para el cultivo. Un cultivo en suelos pobres en nutrientes, por ejemplo, suelos arenoso-pedregosos de la Cordillera Negra (Ancash) no sería rentable. Las tradicionales áreas geográficas de cultivo de la maca se localizan en los Andes centrales y en la meseta del Bombón, en los departamentos de Junín y Pasco, que al año 2003 concentraban el 75 % de la producción total nacional de maca; el 25 % restante se produce en otros departamentos, tales como Ancash, Cajamarca, Huánuco, Huancavelica, Ayacucho, Apurímac y Puno (10). Se indica que en estos últimos departamentos la producción se ha limitado y es casi para autoconsumo o venta local limitada (10).

1.3. CONSTITUYENTES QUÍMICOS

Los hipocotilos secos de Maca poseen aproximadamente un rango de 13 a 16% de proteínas, conteniendo una importante concentración de aminoácidos esenciales. 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. También una cantidad de ácidos grasos insaturados (57.7%) como el ácido linoléico, el cual es el más abundante, seguido por

palmítico y oleico. Por otro lado, los ácidos grasos saturados representan un 40.1%. La tabla I.4 muestra la composición de aminoácidos presentes en el hipocótilo.

Tabla 1. Aminoácidos presentes en *Lepidium meyenii*.

Aminoácidos	mg/g de proteína
Leucina	91.0
Arginina	99.4
Fenilalanina	55.3
Lisina	54.3
Glicina	68.3
Alanina	63.1
Valina	79.3
Isolucina	47.4
Ácido Glutámico	156.5
Serina	50.4
Ácido Aspártico	91.7
Histidina	21.9
Treonina	33.1
Tirosina	30.6
Metionina	28.0
Hidroxiprolina	26.0
Prolina	0.5
Sarcosina	0.70

Fuente: Chemical composition of *Lepidium meyenii* L. [54]

Además, se ha reportado la presencia de minerales en los hipocotilos de Maca, conteniendo hierro (16.6 mg/100g de materia seca), calcio (150 mg/100g de materia seca), cobre (5.9 mg/100g de materia seca), zinc (3.8 mg/100g de materia seca), potasio (2050 mg/100g de materia seca), entre otros [15, 55]. *Lepidium meyenii* L. posee una diversidad de metabolitos secundarios como los macaenos que son ácidos grasos insaturados [56]. Poseen una fracción esteroidea compuesta por β -sitosterol, campesterol y estigmasterol [15]. Por otro lado, también se determinó la presencia de otras sustancias esteroideas como el brassicasterol (9.1%), ergosterol (13.6%), campesterol (27.3%), ergostadienol (4.15%), and sitosterol (45.5%) [16]. Además, se demostró la presencia de alcaloides en los hipocotilos de maca, algunos de ellos fueron designados como macainas y de estos se han

Lepidium meyenii L. posee una diversidad de metabolitos secundarios como los macaenos que son ácidos grasos insaturados [56]. Poseen una fracción esteroidea compuesta por β -sitosterol, campesterol y estigmasterol [15]. Por otro lado, también se determinó la presencia de otras sustancias esteroideas como el brassicasterol (9.1%), ergosterol (13.6%), campesterol (27.3%), ergostadienol (4.15%), and sitosterol (45.5%) [16].

- **Los hipocótilos:** Con respecto al valor nutricional de la maca, se ha determinado que los hipocótilos secos de maca contienen aproximadamente un 13-16% de proteínas y son ricos en aminoácidos esenciales 23. Por otra parte, los hipocótilos frescos contienen un 80% de agua 24 así como altas cantidades de hierro y calcio
- **Glucosinolatos:** Los glucosinolatos son una clase de tioglucidos característicos de las dicotiledóneas, limitados a pocas familias, y en algunos casos a ciertos géneros y especies 25. Estos son almacenados en diferentes tejidos de la planta, constituyendo fuentes importantes de azufre y minerales 26. La maca contiene Glucosinolatos como su principal metabolito secundario 27. La enzima mirosinasa, presente tanto en el tejido dañado de la planta, como en la microflora del tracto digestivo en el humano, convierte este glucosinolato en un número importante de compuestos químicos incluyendo isotiocianatos 28 (Fig. 2) los cuales pueden estar presentes en los extractos de maca 29. Los glucosinolatos más abundantes detectados tanto en el hipocótilo fresco como seco y en las hojas de maca fueron el glucosinolato aromático, bencilglucosinolato (Fig. 3) 30,31,32. Li y Jhons han reportado la presencia de pmetoxibencilglucosinolato 27,32 y m-metoxibencilglucosinolato 27,32, sin embargo, estudios realizados por Dini y Piacente no muestran la presencia de pmetoxibencilglucosinolatos 31,32 El principal componente de la maca parece ser el bencilglucosinolato 31. Estos glucosinolatos pueden convertirse en isotiocianatos biológicamente activos por acción de su hidrólisis a bencil-isotiocianato (Fig. 4) y el p-metoxibencil isotiocianato (Fig. 4) 32, siendo el contenido absoluto de glucosinolatos en los hipocótilos frescos de maca relativamente mayor a los reportados en otras crucíferas 32

- **Ácidos grasos poli insaturados:** Los ácidos grasos poli insaturados presentes en la maca son llamados macaenos y macamidas (alcamidas benciladas) 29. Estos incluyen tres nuevos compuestos: N-bencil octanamida; N-bencil-16 (R, S)-hidroxi-9-oxo10E,12E,14E-octadecatrienamida; y N-bencil-9,16-dioxo-10E,12E,14E-octadecatrienamida 29. Así mismo, un derivado bencilado del 1,2-dihidro-Nhidroxipiridina, llamado macaridina ha sido reportado en esta planta
- **Esteroles:** Los **esteroles** presentes en la maca son: β -sitosterol, campesterol y stigmasterol.
- **Carbolinas:** Se ha reportado que el extracto n-butanolico de maca genera derivados benzoilos del ácido maleico: ácido (1R, 3S)-1-metil-tetrahidro- β -carbolina-3-**carboxílico** (Fig. 6), estos ácidos se generan por reacciones que se dan generalmente en alimentos que son dependientes del pH y la temperatura 33. En las últimas dos décadas se ha prestado mayor atención a las tetrahydrocarbolinas por sus efectos biológicos
- **Flavonoides:** **Entre** los flavonoides presentes en la maca destacan el flavonol y la quercetina.
- **Alcaloides:** Los alcaloides constituyen una variada y amplia familia de metabolitos secundarios, importantes debido a sus propiedades farmacológicas, siendo los metabolitos más frecuentes en el reino vegetal. Se clasifican como alcaloides a aquellas sustancias alcalinas con uno o más átomos de nitrógeno en su sistema cíclico que poseen actividad farmacológica 38. En la maca se han encontrado dos compuestos nuevos, dos alcaloides imidazólicos (Lepidilina A y Lepidilina B) aislados a partir de los extractos de los hipocótilos de la planta, estos han sido químicamente identificados como 1) Clorhidrato de 1,3-dibencil-4,5-dimetilimidazol y 2) Clorhidrato de 1,3-dibencil-2,4,5-trimetilimidazol (Fig. 7).

Otros compuestos presentes en la maca han sido la uridina y el ácido málico³³, así como las prostaglandinas 30 y las antocianinas 40 siendo estas las responsables del color externo de los hipocótilos de maca.

➤ **Macaenos y Macamidas** Definición Se denominan Macaenos y Macamidas a ciertos ácidos grasos poliinsaturados y sus correspondientes amidas presentes en la raíz de Maca, tales como el ácido 5- oxo-(6E, 8E)-octadienoico y su correspondiente Macamida que se presentan en la figura 12. Además, en las raíces de la maca se han encontrado otras **Macamidas**, como se indican en la tabla 1 (Castaño, 2008). El contenido de estos compuestos varía mucho en diferentes muestras de Maca. En Maca seca el contenido de Macaenos oscila entre 0.09% y 0.45% y el de Macamidas entre 0.06% y 0.52% (Castaño, 2008). Algunos autores los refieren como marcadores químicos para la estandarización de la Maca y sus extractos (Gonzales, 2006)

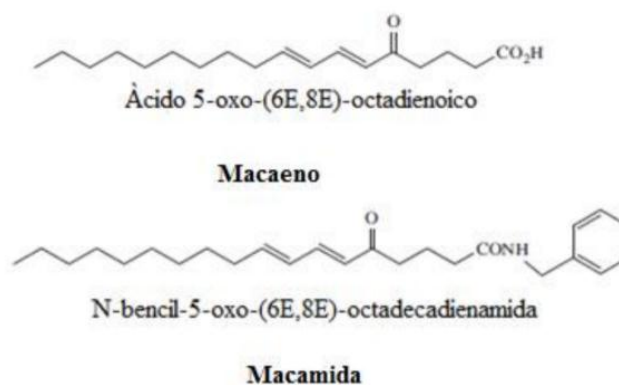


Figura 1 Estructura de un Macaeno y su correspondiente Macamida (8)

Tabla 2 Macamidas presentes en *Lepidium meyenii*

N-Bencil-pentadecanamida	N-(3-Metoxibencil)-9Z-octadecanamida
N-Bencil-hexadecanamida	N-Bencil-(15Z)-tetracosenamida
N-(3-metoxibencil)-hexadecanamida	N-Bencil-9-oxo-(12Z)-octadecenamida
N-Bencil-heptadecanamida	N-Bencil-9-oxo-(12Z,15Z)-octadecadienamida
N-Bencil-octadecanamida	N-Bencil-(9Z,12Z)-octadecadienamida
N-Bencil-13-oxo-(9E,11E)-octadecadienamida	N-(3-Metoxibencil)-(9z-12Z)-octadecadienamida
N-Bencil-5-oxo-(6E,8E)-octadecadienamida	N-Bencil-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida
N-Bencil-(9Z)-octadecenamida	N-(3-Metoxibencil)-(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienamida

➤ **Actividades biológicas de los Macaenos y Macamidias**

Algunos autores sugieren que este grupo de compuestos son biológicamente activos y participan en la mejora de la actividad sexual (Castaño,2008). Se considera que de todos los componentes de la Maca los únicos que tiene una elevada solubilidad en pentano son los Macaenos y Macamidias. En estudios se ha demostrado las propiedades neuroprotectoras del extracto de pentano, pero el mecanismo de acción es desconocido (Hui, et. al, 2013).

1.4. VARIEDADES DE MACA

En estudios realizados en Carhuamayo, Departamento de Junín, se reportaron la presencia de 13 variedades de Maca cuyos colores varían desde el blanco hasta el negro. La variedad más frecuentemente observada es la amarilla (47,8%). Varios autores mencionan a estas variedades definidas por diferentes colores externos como ecotipos, pero en sentido estricto, ecotipo se refiere a una misma variedad que crece en pisos ecológicos diferentes. La Maca de diferentes colores crecen en el mismo terreno y más deberían llamarse cromotipos para diferenciarlos por colores, así como existen quimiotipos (cuando se diferencian sólo por metabolitos secundarios). Un ejemplo de quimiotipos lo constituye la Uncaria Tomentosa con diferentes patrones de alcaloides. Un tipo contiene oxindoles pentacíclicos, mientras que el segundo contiene oxindoles tetracíclicos. Desde el punto de vista morfológico son idénticos. En relación con la Maca no se han descrito aún quimiotipos, lo cual no quiere decir que no existan (Gonzales, 2006). Es preciso comentar que las diferentes coloraciones externas de las raíces de «Maca» se deben principalmente a la presencia de las denominadas antocianinas* y probablemente a la existencia de xantofila⁵ *, que son pigmentos ampliamente distribuidos en los vegetales superiores, confiriéndoles a estos una coloración amarilla, roja o azul (Figura 2) (Obregon, et al., 2006)

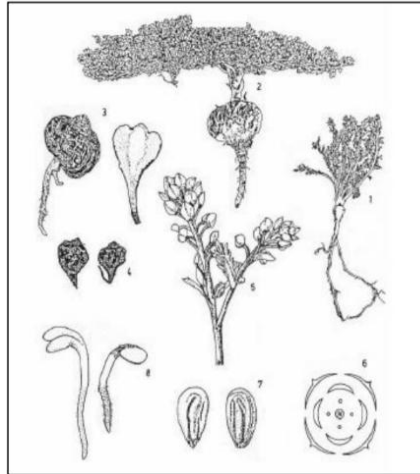


Figura 2 *Lepidium meyenii* (8)

2. GENOMAS

2.1. GENOMA EUCARIOTA

El genoma de un organismo se define como la totalidad del ADN de sus cromosomas y los genes que este contiene. Las organelas de los eucariotas (mitocondrias y plastidios) también contienen ADN. Por lo tanto, se puede hablar de genoma mitocondrial o genoma plástidico para diferenciarlos del genoma nuclear. Todos los individuos de una misma especie tienen distribuido su genoma en un número característico de cromosomas. Por ejemplo, las células somáticas de los humanos tienen 46 cromosomas. Sin embargo, no somos la única especie en tener esa cantidad de cromosomas; algunas especies de animales y vegetales también tienen 46 cromosomas. Por otro lado, el tamaño del genoma no presenta una relación directa con la complejidad del organismo. Las células humanas, por ejemplo, tienen un genoma unas 700 veces más grande que el de la bacteria *E. coli*, pero las células de algunos anfibios y plantas poseen un genoma 30 veces mayor que el de las humanas. Todo esto indica que no es el tamaño del genoma o el número de cromosomas lo que hace única a cada especie, sino la información especificada en los genes de esos cromosomas. Es el orden particular de las bases purinas o pirimidinas, es decir, la secuencia de ADN, la que especifica la exacta instrucción para generar un organismo particular. Como se analizará en detalle luego, no todo el genoma de un organismo lleva información para sintetizar una molécula de

ARN funcional. Así, en la mayoría de los genomas de los vertebrados, los genes no se encuentran yuxtapuestos, sino que están separados por largos segmentos de ADN que constituyen las regiones intergénicas. Estas regiones representan alrededor de un 70 % del total del genoma. Por otro lado, las secuencias de genes eucariotas que codifican proteínas habitualmente no son continuas, sino que están interrumpidas por secuencias no codificantes. Las secuencias no codificantes se denominan intrones y las secuencias codificantes, exones. En consecuencia, los intrones, presentes en el genoma, están ausentes en el ARNm y, por lo tanto, no se traducen en proteínas. Los exones son los segmentos que están presentes en el genoma, en el ARNm precursor nuclear (pre-ARNm), permanecen en el ARNm maduro citoplasmático y son traducidos en proteínas. En la página siguiente se puede ver la organización típica de los genes en un cromosoma de vertebrado. El conocimiento de la organización general del genoma de varias especies demostró las similitudes y diferencias estructurales existentes entre ellas, pero también planteó el desafío de conocer la secuencia de nucleótidos completa del genoma de una especie en particular. Estos emprendimientos científicos son conocidos como Proyectos Genoma y sus aplicaciones tienden a resolver problemas de la medicina, la biotecnología, las fuentes de energía, etc. En la actualidad se han completado los Proyectos Genoma de varias especies, entre ellas el de la mostaza silvestre (*Arabidopsis thaliana*), el de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*), el del gusano (*Caenorhabditis elegans*), el del ratón (*Mus musculus*) y el del humano (*Homo sapiens*).

(12)

2.2. GENES

Según el contexto en que se analiza, un gen puede ser definido de diferentes maneras. Desde el punto de vista mendeliano, un gen es una unidad de herencia que determina una característica fenotípica. De acuerdo con la teoría cromosómica de la herencia, es posible asignar cada uno de los genes de un organismo a un locus específico en los cromosomas, por lo que algunas veces se usa el término locus como sinónimo de gen. La biología celular define gen como una unidad de información determinada por una secuencia específica de nucleótidos que se halla en un sitio particular de un cromosoma. Todas estas definiciones son útiles, pero no abordan el aspecto funcional. En 1909, el

físico británico Archibald Garrod fue el primero en sugerir que los genes dictan los fenotipos por medio de enzimas que catalizan procesos químicos específicos en una célula. Posteriormente, en 1940, Tatum sugirió entonces la hipótesis un gen: una enzima. Para explicar el origen de las proteínas que no son enzimas y las formadas por más de un tipo de unidad, fue necesario adoptar una expresión más exacta y global de lo que es un gen y así se propuso la hipótesis un gen: un polipéptido. Aun esta definición debe ser refinada y ampliada. Por un lado, la mayoría de los genes eucariotas contienen intrones que pueden ser procesados de manera regulada mediante splicing alternativo; por otro lado, existen largas porciones de esos genes que no poseen un segmento correspondiente a un polipéptido –por ejemplo, las regiones 5' y 3' UTR, la cola de poli(A)–. También es aceptado que las regiones promotoras y las secuencias reguladoras, que no son transcritas a ARN, son parte de un gen funcional ya que deben estar presentes para que ocurra la transcripción. Además, una definición molecular debería ser lo suficientemente amplia como para incluir el ADN que lleva la información para sintetizar ribozimas, ARNr, ARNt y snARN. Una definición más adecuada de gen sería "una región del ADN requerida para la síntesis de un ARN función (12).

2.3. LA EXPRESION GENICA

La información genética de una célula está contenida en su ADN, el cual contiene la información necesaria para crear miles de moléculas diferentes y, con ello, conformar un individuo completo.

Un organismo procariótico, como una bacteria, consta de millones de nucleótidos, en tanto que uno eucariótico, como el ser humano, de varios billones. A pesar de contener toda esa información, la célula sólo expresa una fracción de sus genes, lo que le otorga un fenotipo característico. Así, cada uno de los 10 000 tipos de células que constituyen los organismos multicelulares expresan genes diferentes.

Aunque los diversos tipos de células en un organismo multicelular contienen la misma información genética, su estructura y función difieren ampliamente. Una neurona y un linfocito, por ejemplo, son muy diferentes, por lo que es difícil pensar que estas dos células contienen el mismo genoma como sucede en realidad. Por esta razón, se creía que los genes se perdían cuando las células se diferenciaban. Ahora se sabe que las

células de un organismo multicelular son distintas porque sintetizan diferentes ARN mensajeros (ARNm) y, por ende, diferentes proteínas a partir del mismo genoma.

El término expresión génica se refiere al proceso mediante el cual la información codificada en un gen se transcribe en uno o varios ARN funcionales. La expresión de un gen se inicia con el proceso de transcripción controlado por proteínas denominadas factores transcripcionales, regulados por señales recibidas por las células, y concluye con la producción de un ARN funcional y, posteriormente, en el caso de los ARNm, con la traducción de una proteína madura y activa. Los factores transcripcionales son proteínas de unión al ADN que reconocen una secuencia específica y se requieren para el encendido y apagado de los genes. La expresión de un gen se regula en diferentes niveles, desde su inicio hasta su terminación. (13)

2.3.1. ¿Cómo se expresan los genes?

Unos años después de haber propuesto el modelo estructural del ADN, Francis Crick propuso "el dogma central de la biología molecular", que dice que la información fluye en el sentido: ADN → ARN → proteína. Según sus palabras, "una vez que la información pasó a una proteína no puede salir nuevamente". Este flujo de la información consta de dos etapas: primero, en la transcripción, se copia la información de la secuencia de ADN en información correspondiente a una secuencia de ARN. Luego, durante la traducción, esta información se traduce en una secuencia de aminoácidos, es decir, una proteína. Si bien el flujo de la información es en un solo sentido, en algunos casos la transcripción puede ser invertida: ARN → ADN. Esta reacción ocurre mediante enzimas específicas llamadas transcriptasas reversas, presentes, por ejemplo, en los retrovirus como el VIH. Sin embargo, la traducción nunca puede ser invertida. Es decir, la información contenida en una proteína no puede pasar al ADN. Esto explica por qué no es posible heredar los caracteres adquiridos de los progenitores. ¿Cómo pasa la información del núcleo (donde está el ADN) a las proteínas (que son sintetizadas en el citoplasma)? ¿Cuál es la relación entre una secuencia de nucleótidos específica y la secuencia de aminoácidos en una proteína? Para responder a estos interrogantes, Crick postuló la existencia de moléculas mensajeras y moléculas adaptadoras. Hoy sabemos que esas moléculas

son distintas clases de ARN. El ARN es un ácido nucleico muy semejante al ADN, pero entre ambas moléculas hay diferencias:

- El azúcar que compone el ARN es ribosa, en lugar de desoxirribosa.
- En lugar de timina, el ARN contiene una pirimidina relacionada, el uracilo (U).
- El ARN se encuentra como cadena simple y no forma una estructura helicoidal regular como el ADN.

A pesar de esto último, algunas moléculas de ARN presentan una estructura secundaria, es decir que ciertas zonas de la molécula pueden formar bucles o doble cadena por apareamiento de bases dentro de la misma molécula. Todas las células tienen diferentes clases de ARN. Los tres más importantes son el ARN ribosomal (ARNr) –se encuentra en los ribosomas, que es el lugar físico donde ocurre la traducción–, el ARN mensajero (ARNm) –pasa del núcleo al citoplasma llevando la información desde los cromosomas hacia el ribosoma para dirigir la síntesis proteica– y el ARN de transferencia (ARNt) –transporta los aminoácidos al ribosoma para ser utilizados durante la traducción; son las moléculas adaptadoras entre nucleótidos y aminoácidos–. Estos tres tipos de ARN, junto con proteínas ribosomales y ciertas enzimas, constituyen el sistema que lleva a cabo la lectura del mensaje genético y la producción de una proteína.

2.3.2. 2.3.2 El proceso de Transcripción

Todas las moléculas de ARN son sintetizadas por el proceso de transcripción a partir de una secuencia de ADN, en reacciones catalizadas por ARN polimerasas. Estas enzimas operan moviéndose en dirección 3'J5' a lo largo de la cadena molde de ADN, sintetizando una nueva cadena de ribonucleótidos en la dirección 5'J3'. Esa cadena de ARN recién sintetizada se llama transcripto primario o pre-ARNm. Como resultado, la secuencia de nucleótidos del transcripto primario es antiparalela y complementaria de la secuencia de ADN de la que es transcripta. Es importante destacar que una molécula de ARN se copia sólo de una de las dos cadenas de ADN. Entonces, si sólo una hebra de ADN se transcribe, ¿cómo selecciona la ARN polimerasa la hebra correcta de ADN? La enzima reconoce en cada gen una secuencia

determinada de nucleótidos, el promotor, y se une a ella. Esta unión establece el sitio donde comienza la transcripción y el sentido de avance de la ARN polimerasa. Dado que esta enzima sólo puede fabricar ARN en sentido 5'J3', una vez fijado el sentido de avance, sólo puede transcribirse la hebra de ADN que corre en sentido 3'J5'. La otra hebra, que posee la secuencia complementaria y corre en sentido 5'J3', no es reconocida por la enzima y, por lo tanto, no es transcripta a ARN. La ARN polimerasa reconoce y se une al promotor y esto hace que la doble hélice de ADN se abra y comience la transcripción. Luego, la enzima va añadiendo ribonucleótidos, moviéndose a lo largo de la cadena molde, desenrollando la hélice y exponiendo nuevas regiones con las que se aparearán los ribonucleótidos complementarios. La cadena de ARN en crecimiento permanece brevemente unida por puentes de hidrógeno al ADN molde (sólo 10 o 12 ribonucleótidos están unidos al ADN en cualquier instante dado) y luego se desprende como una cadena simple.

2.3.3. ¿Cómo se traduce el mensaje genético?

Finalizada la transcripción, las modificaciones de los extremos 5' y 3' y el splicing, el ARNm es exportado al citoplasma donde se traduce el mensaje. Durante la traducción, el orden de nucleótidos del ARNm especifica el orden de aminoácidos en un polipéptido. De acuerdo con el código genético, cada triplete o codón en el ARNm codifica un aminoácido en particular. El código genético está compuesto por 64 codones: 61 de ellos especifican aminoácidos y los otros 3 son iniciación se completa cuando la subunidad ribosómica grande se une a estas estructuras. El ribosoma armado contiene ahora 3 sitios: A, P y E; en este momento, el complejo ARNt-MET ocupa el sitio P y los sitios A y E quedan vacantes. La elongación comienza cuando un segundo aminoacil-ARNt se coloca en el sitio A y su anticodón se acopla con el ARNm. Se forma un enlace peptídico entre los dos aminoácidos. Lo interesante es que esta reacción es catalizada por un pequeño ARN presente en la subunidad mayor del ribosoma. A estos ARN con actividad enzimática se los denomina ribozimas. Al mismo tiempo que ocurre la unión de dos aminoácidos se rompe el enlace entre el primer aminoácido y su ARNt. El ribosoma se mueve a lo largo de la cadena de ARNm en una dirección 5'J3', y el segundo ARNt, con el dipéptido unido (peptidil-

ARNt), se mueve desde el sitio A al sitio P. El primer ARNt se mueve hacia el sitio E y se desprende del ribosoma, dejando el aminoácido que transportaba en el péptido en formación. En suma, durante la elongación del péptido, el sitio A une el aminoacil-ARNt correspondiente al aminoácido que deberá incorporarse al péptido en formación, el sitio P une el peptidil-ARNt y el sitio E es el sitio de salida para el ARNt que estuvo previamente unido al sitio P. Un tercer aminoacil-ARNt se coloca en el sitio A y se forma otro enlace peptídico. La cadena peptídica naciente siempre está unida al ARNt que se está moviendo del sitio A al sitio P, y el aminoacil-ARNt entrante siempre ocupa el sitio A. Este paso se repite una y otra vez incorporando los distintos aminoácidos hasta que se completa el polipéptido. La terminación ocurre cuando el ribosoma alcanza un codón de terminación, el polipéptido se escinde del último ARNt y el ARNt se desprende del sitio E. El sitio A es ocupado por un factor de liberación que produce la disociación de las dos subunidades del ribosoma.

3. REACCION EN CADENA DE LA POLIMERSA EN TIEMPO REAL (qPCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una de las más poderosas tecnologías en biología molecular. Usando PCR, secuencias específicas dentro de una plantilla de ADN o ADNc pueden ser copiadas, o "amplificadas", muchos miles a un millón usando oligonucleótidos específicos de secuencia, ADN termoestable polimerasa y ciclo térmico. En tradicional (punto final) PCR, detección y cuantificación de la amplificada secuencia se realizan al final de la reacción después del último ciclo de PCR, e implican análisis posteriores a la PCR tales como electroforesis en gel y análisis de imágenes. En tiempo real PCR cuantitativa (qPCR), el producto de PCR se mide en cada ciclo. Al monitorear las reacciones durante la amplificación exponencial fase de la reacción, los usuarios pueden determinar la cantidad inicial del objetivo con gran precisión. PCR teóricamente amplifica el ADN exponencialmente, duplicando el número de moléculas diana con cada amplificación ciclo. Cuando se desarrolló por primera vez, los científicos razonaron que la cantidad de ciclos y la cantidad de producto final de PCR podría usarse para calcular la cantidad inicial de genética material en comparación con un estándar conocido. Dirigirse la necesidad de una cuantificación robusta, la técnica del tiempo real PCR cuantitativa fue desarrollada.

Actualmente, la PCR punto final se usa principalmente para amplificar ADN específico para la secuenciación, clonación y uso en otras técnicas de biología molecular. (13)

En la PCR en tiempo real, la cantidad de ADN se mide después de cada ciclo a través de tintes fluorescentes que producen aumento en la señal fluorescente en proporción directa al número de moléculas de producto de PCR (amplicones) generadas. Datos recogidos en la fase exponencial del rendimiento de la reacción brinda información cuantitativa sobre la cantidad de inicio del objetivo de amplificación.

Reporteros fluorescentes utilizados en tiempo real.

La PCR incluye el enlace de ADN bicatenario (ADNs) colorantes o moléculas de colorante unidos a cebadores o sondas de PCR que se hibrida con productos de PCR durante la amplificación. El cambio en la fluorescencia en el transcurso de la reacción se mide con un instrumento que combina térmica ciclaje con capacidad de escaneo de tinte fluorescente. Al trazar fluorescencia contra el número de ciclo, la PCR en tiempo real instrumento genera un diagrama de amplificación que representa la acumulación de producto durante la duración de la totalidad Reacción de PCR.

Las ventajas de la PCR en tiempo real incluyen:

- Capacidad para controlar el progreso de la reacción de PCR tal como ocurre en tiempo real.
- Capacidad de medir con precisión la cantidad de amplicón en cada ciclo, lo que permite una cuantificación altamente precisa de la cantidad de material de partida en muestras.
- Un mayor rango dinámico de detección.
- La amplificación y la detección se producen en un solo tubo, lo que elimina las manipulaciones posteriores a la PCR Durante los últimos años, la PCR en tiempo real se ha convertido en la herramienta líder para la detección y cuantificación de ADN o ARN.

Usando estas técnicas, puede lograr una detección precisa que sea precisa dentro de un rango de 2 veces, con un rango dinámico de material de entrada que abarca de 6 a 8 órdenes de magnitud.

3.1. Pasos de la PCR en tiempo real

Hay tres pasos principales que componen cada ciclo en una reacción de PCR en tiempo real. Las reacciones generalmente se realizan durante 40 ciclos.

- A. Desnaturalización:** La incubación a alta temperatura se usa para "Derretir" el ADN bicatenario en hebras únicas y aflojar la estructura secundaria en ADN monocatenario. La temperatura más alta que la ADN polimerasa puede resistir se usa típicamente (generalmente 95 ° C) el tiempo de desnaturalización puede aumentarse si la plantilla GC el contenido es alto.
- B. Hibridación:** Durante el recocido, complementario secuencias tienen la oportunidad de hibridar, por lo que una la temperatura adecuada se utiliza que se basa en la temperatura de fusión calculada (T_m) de los cebadores (típicamente 5 ° C por debajo de la T_m del cebador).
- C. Extensión:** A 70-72 ° C, la actividad del ADN la polimerasa es óptima y se produce la extensión del cebador a velocidades de hasta 100 bases por segundo. Cuando un amplicón en PCR en tiempo real es pequeño, este paso es a menudo combinado con el paso de recocido, utilizando 60 ° C como temperatura.

3.2. QRT-PCR de dos pasos

PCR de transcriptasa inversa cuantitativa en dos pasos (qRT-PCR) comienza con la transcripción inversa del ARN total o poli (A) ARN en ADNc utilizando una transcriptasa inversa (RT). Esta primera síntesis de la síntesis de ADNc puede prepararse usando cebadores aleatorios, oligo (dT) o cebadores específicos de genes (GSP) Para dar una representación igual de todos los objetivos en aplicaciones de PCR en tiempo real y para evitar el sesgo de cebadores oligo (dT), muchos investigadores usan cebadores aleatorios o una mezcla de oligo (dT) y cebadores aleatorios.

La temperatura utilizada para la síntesis de ADNc depende en la enzima RT elegida. Después de la transcripción inversa, aproximadamente el 10% del cDNA se transfiere a un tubo para la reacción de PCR en tiempo real. (14)

3.3. QRT-PCR de un paso

QRT-PCR de un solo paso combina el cDNA de primera cadena reacción de síntesis y reacción de PCR en tiempo real en el mismo tubo, simplificando la configuración de la reacción y reduciendo la posibilidad de contaminación. Cebadores específicos de genes (GSP) son requeridos. Esto es porque usa oligo (dT) o aleatorios cebadores generarán productos no específicos en un solo paso procedimiento y reducir la cantidad de producto de interés

3.4. Descripción general de los componentes de PCR en tiempo real

Esta sección proporciona una visión general de la reacción principal componentes y parámetros involucrados en PCR en tiempo real experimentos. Una discusión más detallada de componentes como tintes informadores, tintes pasivos de referencia y uracilo ADN glicosilasa (UDG) se proporciona en posteriores secciones de este manual.

ADN polimerasa

El rendimiento de PCR a menudo está relacionado con el termoestable ADN polimerasa, por lo que la selección de enzimas es fundamental para éxito. Uno de los principales factores que afectan la especificidad de la PCR es el hecho de que la Taq ADN polimerasa tiene actividad residual a bajas temperaturas. Los cebadores pueden aparearse inespecíficamente al ADN durante la configuración de la reacción, permitiendo que la polimerasa sintetizar producto no específico. El problema de lo inespecífico los productos resultantes de un cebado incorrecto pueden minimizarse mediante el uso de una enzima de "inicio en caliente". Usando una enzima de inicio en caliente asegura que la ADN polimerasa no está activa durante la reacción configuración y el paso inicial de desnaturalización del ADN. (14)

La transcriptasa inversa

La transcriptasa inversa (RT) es tan crítica para el éxito de qRT-PCR como la ADN polimerasa. Es importante elija un RT que no solo proporcione altos rendimientos de longitud completa ADNc, pero también tiene buena actividad a altas temperaturas.

El rendimiento a altas temperaturas también es muy importante para la desnaturalización del ARN con estructura secundaria. En qRT-PCR de un paso, una RT que conserva su actividad a una mayor temperatura le permite usar un GSP con un alto punto de fusión temperatura (T_m), aumentando la especificidad y reduciendo fondo.

dNTPs

Es una buena idea comprar tanto los dNTP como ADN polimerasa termoestable del mismo proveedor, ya que no es raro ver una pérdida en la sensibilidad de uno ciclo de umbral completo (Ct) en experimentos que emplean estos reactivos de proveedores independientes.

Concentración de magnesio

En PCR en tiempo real, cloruro de magnesio o magnesio el sulfato se usa típicamente a una concentración final de 3 mM. Esta concentración funciona bien para la mayoría de los objetivos; sin embargo, la concentración óptima de magnesio puede variar entre 3 y 6 mM.

Buena técnica experimental

No subestimes la importancia del buen laboratorio técnica. Lo mejor es usar equipo dedicado y soluciones para cada etapa de las reacciones, desde la preparación de la plantilla para el análisis posterior a la PCR. El uso de aerosolbarrier las puntas y los tubos con tapa de rosca pueden ayudar a disminuir problemas de contaminación cruzada. Para obtener datos ajustados de réplica (idealmente, triplicados), prepare una mezcla maestra que contiene todos los componentes de reacción excepto la muestra. El uso de una mezcla maestra reduce el número de pasos de pipeteo y, en consecuencia, reduce las posibilidades de cross-well contaminación y otros errores de pipeteo. (14)

Templado

Use de 10 a 1,000 copias de ácido nucleico modelo para cada reacción de PCR en tiempo real. Esto es equivalente a aproximadamente 100 pg a 1 µg de ADN genómico, o ADNc generado a partir de 1 pg a 100 ng de ARN total. El exceso de plantilla también puede traer mayores niveles de contaminantes que pueden reducir en gran medida la PCR eficiencia. Dependiendo de la especificidad de los cebadores de PCR

para ADNc en lugar de ADN genómico, puede ser importante tratar plantillas de ARN para reducir la posibilidad de que contengan contaminación de ADN genómico. Una opción es tratar la plantilla con DNasa I.

El ARN puro e intacto es esencial para una larga duración y alta calidad síntesis de cDNA y puede ser importante para la precisión cuantificación de ARNm. El ARN debe estar desprovisto de cualquier La contaminación por RNasa y las condiciones asépticas deben mantenidos. El ARN total generalmente funciona bien en qRT-PCR;

el aislamiento del ARNm no suele ser necesario, aunque puede mejorar el rendimiento de ADNc específicos. (14)

3.5. Tecnología de análisis de PCR en tiempo real

Línea Base

La línea base de la reacción de PCR en tiempo real se refiere al nivel de señal durante los ciclos iniciales de PCR, generalmente ciclos 3 a 15, en el que hay poco cambio en la señal fluorescente. La señal de bajo nivel de la línea de base se puede equiparar al fondo o el "ruido" de la reacción (Figura 2). La línea de base en PCR en tiempo real se determina empíricamente para cada reacción, por análisis del usuario o análisis automatizado de el diagrama de amplificación. La línea base debe establecerse cuidadosamente para permitir la determinación precisa del ciclo umbral (Ct), definido a continuación. La determinación de referencia debería tomar en cuenta ciclos suficientes para eliminar el fondo encontrado en los primeros ciclos de amplificación, pero no debería incluir los ciclos en los que comienza la señal de amplificación para elevarse por encima del fondo. Al comparar diferentes tiempos reales. Reacciones de PCR o

experimentos, la línea de base debe ser definido de la misma manera para cada uno (Figura 2).

Umbral (THRESHOLD)

El umbral de la reacción de PCR en tiempo real es el nivel de señal que refleja un aumento estadísticamente significativo sobre la señal de referencia calculada (Figura 2).

Esta organizado para distinguir la señal de amplificación relevante de la

fondo. Por lo general, software de instrumento de PCR en tiempo real establece automáticamente el umbral en 10 veces el estándar desviación del valor de fluorescencia de la línea de base.

Sin embargo, la posición del umbral se puede establecer en cualquier punto en la fase exponencial de PCR. (14)

Ciclo Umbral (Ct)

El ciclo de umbral (Ct) es el número de ciclo en el que la señal fluorescente de la reacción cruza el umbral. El Ct se usa para calcular el número de copia de ADN inicial, porque el Ct es el valor está inversamente relacionado con el comienzo cantidad de objetivo. Por ejemplo, al comparar en tiempo real

Resultados de PCR de muestras que contienen diferentes cantidades de objetivo, una muestra con el doble de la cantidad inicial dará como resultado un Ct con un ciclo antes que una muestra con el doble de la cantidad de copias del objetivo, relativas a una segunda muestra, tener un Ct un ciclo anterior al de la segunda muestra. Esto supone que la PCR está funcionando con una eficiencia del 100% (es decir, la cantidad de producto se duplica a la perfección durante cada ciclo) en ambas reacciones.

A medida que la cantidad de la plantilla disminuye, el número de ciclo en cuya amplificación significativa se ve aumenta. Con un Serie de dilución 10 veces, el Ct los valores están ~ 3.3 ciclos de diferencia.

Curva estándar

Una serie de diluciones de concentraciones de plantillas conocidas puede ser utilizado para establecer una curva estándar para determinar la inicial cantidad de inicio de la

plantilla de destino en muestras experimentales o para evaluar la eficiencia de la reacción (Figura 4). El registro de cada concentración conocida en la serie de dilución (eje x) se traza contra el Ct valor para esa concentración (eje y) A partir de esta curva estándar, información sobre el rendimiento de la reacción, así como varias reacciones parámetros (incluyendo pendiente, intersección de y, y correlación coeficiente) puede derivarse. Las concentraciones elegidas para la curva estándar deben abarcar lo esperado rango de concentración del objetivo en el experimento muestras. (14)

Coefficiente de correlación (R^2)

El coeficiente de correlación es una medida de qué tan bien los datos se ajustan a la curva estándar. El R^2 valor refleja la linealidad de la curva estándar. Idealmente, $R^2=1$, aunque 0.999 es generalmente el valor máximo.

Intercepto Y

El intercepto y corresponde al límite teórico de detección de la reacción, o el Ct valor esperado si el número más bajo de copias de las moléculas diana indicadas en el eje x, dio lugar a una amplificación estadísticamente significativa.

Aunque PCR es teóricamente capaz de detectar un solo copia de un objetivo, un número de copia de 2-10 es comúnmente especificado como el nivel objetivo más bajo que puede ser fiable cuantificado en aplicaciones de PCR en tiempo real. Esto limita la utilidad del valor del intercepto en y como una medida directa de sensibilidad. Sin embargo, el valor del intercepto y puede ser útil para comparando diferentes sistemas de amplificación y objetivos. (14)

Fase exponencial

Es importante cuantificar su reacción de PCR en tiempo real en la primera parte de la fase exponencial en comparación con en los ciclos posteriores o cuando la reacción alcanza la meseta. En el a partir de la fase exponencial, todos los reactivos están todavía en exceso, la ADN polimerasa sigue siendo altamente eficiente, y el producto de amplificación, que está presente en una cantidad baja, no competirá con las capacidades de recocido de los cebadores. Todos estos factores contribuyen a datos más precisos.

Eficiencia

Una eficiencia de PCR del 100% corresponde a una pendiente de -3,32, como lo determina la siguiente ecuación: Eficiencia = $10^{-1/\text{pendiente}}$ - 1. Idealmente, la eficacia (E) de una reacción de PCR debería ser del 100%. lo que significa que la plantilla se duplica después de cada ciclo térmico durante la amplificación exponencial. La eficiencia real puede dar información valiosa sobre la reacción. Factores experimentales tales como la longitud, estructura secundaria y GC el contenido del amplicón puede influir en la eficiencia. Otras condiciones que pueden influir en la eficiencia son las dinámicas de la reacción en sí, el uso de reactivo no óptimo concentraciones y calidad de la enzima, lo que puede eficiencias por debajo del 90%. La presencia de inhibidores de PCR en uno o más de los reactivos puede producir eficiencias de más del 110%. Una buena reacción debería tener una eficiencia entre 90% y 110%, que corresponde a un pendiente de entre -3.58 y -3.10. (14)

Gama dinámica

Este es el rango sobre el cual un aumento en comenzar la concentración material da como resultado un aumento correspondiente en producto de amplificación. Idealmente, el rango dinámico para la PCR en tiempo real debería ser de 7 a 8 órdenes de magnitud para ADN plasmídico y al menos un rango de registro de 3-4 para ADNc, ADN genómico.

Cuantificación absoluta

La cuantificación absoluta describe una PCR en tiempo real experimento en el cual muestras de cantidad conocida son en serie diluido y luego amplificado para generar una curva estándar. Las muestras desconocidas se cuantifican por comparación con esta curva

Cuantificación relativa

La cuantificación relativa describe una PCR en tiempo real experimento en el que la expresión de un gen de interés en una muestra (es decir, tratado) se compara con la expresión del mismo gen en otra muestra (es decir, sin tratar). Los resultados se expresan como el doble de cambio (aumento o disminución) en la expresión de la muestra tratada

en relación con la muestra no tratada. Un gen normalizador (como β -actina) se usa como control de la variabilidad experimental en este tipo de cuantificación. (14)

Curva de fusión (curva de disociación)

Una curva de fusión muestra el cambio en fluorescencia observado cuando ADN de doble cadena (dsDNA) con tinte incorporado las moléculas se disocian ("se derriten") en ADN monocatenario (ssDNA) a medida que aumenta la temperatura de la reacción. Por ejemplo, cuando el ADN bicatenario se une con SYBR®

El tinte verde I se calienta, una disminución repentina de la fluorescencia se detecta cuando se alcanza el punto de fusión (T_m), debido a disociación de las cadenas de ADN y posterior liberación del tinte. La fluorescencia se traza frente a la temperatura (Figura 5A), y luego el $-\Delta F / \Delta T$ (cambio en fluorescencia / cambio en la temperatura) se representa frente a la temperatura para obtener una vista clara de la dinámica de fusión (Figura 5B).

El análisis de la curva de fusión posterior a la amplificación es simple, forma sencilla de verificar las reacciones de PCR en tiempo real para artefactos de dímero de cebador y para garantizar la especificidad de la reacción. Porque la temperatura de fusión de los ácidos nucleicos es afectada por la longitud, el contenido de GC y la presencia de base desajustes, entre otros factores, diferentes productos de PCR

a menudo se puede distinguir por sus características de fusión.

La caracterización de productos de reacción (p. Ej., Cebadores de primers frente a amplicones) a través del análisis de la curva de fusión reduce la necesidad de una electroforesis en gel que consume mucho tiempo. El conjunto típico de datos de PCR en tiempo real que se muestra en la Figura 6 ilustra muchos de los términos que se han discutido.

Durante los primeros ciclos de la reacción de PCR, hay poco cambio en la señal fluorescente. A medida que la reacción progresa, el nivel de fluorescencia comienza a aumentar con cada ciclo. El umbral de reacción se establece por encima de la línea de base en la porción exponencial de la trama. Este umbral se usa para asignar el ciclo umbral, o C_t valor, de cada amplificación reacción. Los valores C_t para una serie de

reacciones que contienen una cantidad conocida de blanco se puede utilizar para generar un estándar curva. La cuantificación se realiza comparando valores Ct para muestras desconocidas contra esta curva estándar o, en el caso de cuantificación relativa, uno contra el otro, con la curva estándar que sirve como un control de eficiencia. Los valores Ct son inversamente relacionado con la cantidad de plantilla inicial: la mayor la cantidad de plantilla inicial en una reacción, bajar el valor Ct para esa reacción. (14)

3.6. Sistemas de detección de fluorescencia de PCR en tiempo real

Química de PCR fluorescente en tiempo real

Existen muchas químicas de PCR fluorescentes en tiempo real, pero los más utilizados son los ensayos de 5 nucleasa como TaqMan® Ensayos basados en colorantes verdes SYBR® (Figura 7). El ensayo de 5 nucleasa se llama así por la actividad de 5 nucleasa asociado con Taq DNA polimerasa (Figura 8). El dominio de 5 nucleasa tiene la capacidad de degradar el ADN unido a la plantilla, aguas abajo de la síntesis de ADN. (14)

Un segundo elemento clave en el ensayo de nucleasa 5 es un fenómeno llamado energía de resonancia de fluorescencia transferencia (FRET). En FRET, las emisiones de un fluorescente colorante pueden reducirse fuertemente por la presencia de otro tinte, a menudo llamado quencher, muy cerca. FRET se puede ilustrar con dos tintes fluorescentes: verde y rojo (Figura 9). El tinte verde fluorescente tiene una mayor energía de emisión en comparación con el rojo, porque la luz verde tiene una longitud de onda más corta en comparación con el rojo. Si el tinte rojo está muy cerca del tinte verde, la excitación del tinte verde causará la emisión verde energía que se transferirá al tinte rojo. En otras palabras, la energía se transfiere de un nivel más alto a uno más bajo nivel. En consecuencia, la señal del tinte verde se suprimido o "apagado". Sin embargo, si los dos tintes no están cerca, FRET no puede ocurrir, permitiendo el tinte verde para emitir su señal completa. (14)

Un ensayo de nucleasa de 5 para la detección o cuantificación del objetivo típicamente consta de dos cebadores de PCR y una sonda TaqMan® (Figura 10). Antes de que comience la PCR, la sonda TaqMan® está intacta y tiene un grado de flexibilidad.

Mientras la sonda está intacta, el periodista y el quencher tiene una afinidad natural el uno por el otro, permitiendo que ocurra FRET (Figura 11). La señal del reportero es apagada antes de la PCR. Durante la PCR, los cebadores y la sonda se hibridan con el objetivo. El ADN polimerasa extiende el cebador cadena arriba de la sonda. Si la sonda está ligada a la secuencia objetivo correcta, la actividad nucleasa 5 de la polimerasa escinde la sonda, liberando un fragmento que contiene el colorante informador. Una vez se produce escisión, los colorantes reportero y extintor son ya no se atraen el uno al otro; el reportero liberado la molécula ya no se apagará.

Colorante verde SYBR®

El colorante SYBR® Green I es un colorante fluorescente de unión a ADN que se une al surco menor de cualquier ADN bicatenario. La excitación del colorante verde SYBR® unido a ADN produce una señal fluorescente mucho más fuerte en comparación con sin consolidar colorante. Un ensayo basado en colorante verde SYBR® típicamente consiste en dos cebadores de PCR. En condiciones ideales, un SYBR® Green el ensayo sigue un patrón de amplificación similar al de un ensayo basado en sondas TaqMan®. En los primeros ciclos de PCR, una se observa la línea base horizontal. Si el objetivo estaba presente en la muestra, se acumulará suficiente producto PCR acumulado ser producido en algún momento para que la señal de amplificación se vuelve visible (14)

Especificidad del ensayo SYBR® Green

La prueba de especificidad de ensayo es importante para todos los ensayos, pero especialmente para aquellos más vulnerables a problemas de especificidad.

Los ensayos SYBR® Green no se benefician de la especificidad de una sonda TaqMan®, haciéndolos más vulnerables a problemas de especificidad El colorante verde SYBR® se unirá a cualquier producto amplificado, objetivo o no, y todos los las señales se suman, produciendo una única gráfica de amplificación. La forma del diagrama de amplificación verde SYBR® no se puede usar para evaluar la especificidad Las parcelas generalmente tienen la misma apariencia, si la amplificación consiste en

objetivo, no objetivo o una mezcla. El hecho de que un ensayo SYBR® Green produjera la amplificación no debe tomarse automáticamente para significar la mayoría de cualquiera de la señal se deriva del objetivo.

Dado que la amplificación de no objetivo puede variar de la muestra para muestrear, al menos un tipo de evaluación de especificidad debe realizarse por cada reacción SYBR® Green. Más comúnmente, esta evaluación continua es la disociación análisis. (14)

Disociación del colorante verde SYBR®

La disociación verde SYBR® es la fusión gradual de los productos de PCR después de PCR cuando se usa SYBR® Green-basado en la detección. La disociación es una opción atractiva para la especificidad evaluación porque no agrega costos al experimento y puede hacerse bien en el recipiente de reacción de PCR. Sin embargo, la disociación agrega más tiempo al protocolo térmico, requiere tiempo de análisis adicional, es algo subjetivo, y tiene una resolución limitada.

El concepto de disociación SYBR® Green es que, si el objetivo es una secuencia genética definida, debe tener un específico temperatura de fusión (T_m), que se utiliza para ayudar a identificar el objetivo en muestras. Algunos productos no objetivo tendrán valores significativamente diferentes de la del objetivo, permitiendo la detección de esas amplificaciones no objetivo. El protocolo de disociación se agrega después del ciclo de PCR final. Después del proceso de fusión, el software de PCR en tiempo real trazará los datos como la primera derivada negativa, que transforma el perfil de fusión en un pico. La identificación precisa del pico objetivo depende de amplificación del objetivo puro. Muchas muestras como celular El ARN y el ADN genómico exhiben una alta complejidad genética, creando oportunidades para la amplificación no objetivo que puede suprimir la amplificación del objetivo o, en algunos casos, alterar la forma del pico de fusión. Comenzando por objetivo puro, el investigador podrá asociar un pico T_m y forma con un objetivo particular después de la amplificación. Solo se debe observar un pico. El objetivo presuntivo el pico debe ser estrecho, simétrico y carente de otras anomalías, como hombros, jorobas o divisiones. Estas las anomalías son fuertes indicaciones de que múltiples productos de valores de T_m similares se produjeron,

lanzando fuerte dudas sobre la especificidad de esas reacciones. Pozos con las anomalías de disociación deben omitirse de análisis. La disociación verde SYBR® es de baja resolución y puede que no diferenciar entre objetivo y no objetivo con T_m similar valores (por ejemplo, homólogos). Por lo tanto, uno, estrecho simétrico pico no debe ser asumido como el objetivo, ni uno producto, sin información de apoyo adicional.

Los datos de disociación deben evaluarse para cada pozo donde amplificación se observó. Si la muestra contiene un pico eso no corresponde al pico objetivo puro, la conclusión es que el objetivo no se detectó en esa reacción. Si la muestra contiene un pico que parece coincidir con el T_m y forma del pico objetivo puro, el objetivo puede tener amplificado en esa reacción. Datos de disociación en aislamiento no se puede tomar como definitivo, pero cuando se combina con otra información, como datos del objetivo negativo muestras, secuenciación o geles pueden brindar más confianza en especificidad (14)

4. GENES IMPLICADOS EN LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

4.1. Proteína Precursora de Amiloide (APP)

APP es uno de los miembros de una pequeña familia de genes, que incluye APLP1 y APLP2 en humanos, y codifican proteínas de membrana tipo I con un gran dominio extracelular y una pequeña región citoplasmática que presentan procesamiento similar. Solamente APP contiene la secuencia que codifica para el dominio A. El gen APP humano se localiza en el cromosoma 21. Se han identificado más de 25 mutaciones en este gen que son causa de FAD y sustituyen aminoácidos dentro o cerca del dominio $A\beta$ (Thinakaran G y Koo EH, 2008). El splicing alternativo de APP produce 3 isoformas principales de 695, 751 y 770 residuos que se expresan igualmente; éstas migran entre 110 y 140 kDa en un gel de electroforesis y pasan por una variedad de modificaciones postraduccionales (Selkoe DJ et al., 1988; Oltersdorf T et al., 1990). Las isoformas de APP que contienen 751 o 770 aminoácidos se expresan ampliamente en células no neuronales y también en las neuronas; sin embargo, las neuronas expresan niveles más elevados de la isoforma de 695 residuos (Haass C et al., 1991). La diferencia entre

isoformas es la presencia de un exón que codifica para un segmento homólogo a los inhibidores de serina proteasa tipo Kunitz (KPI) (Figura N° 3) (15).

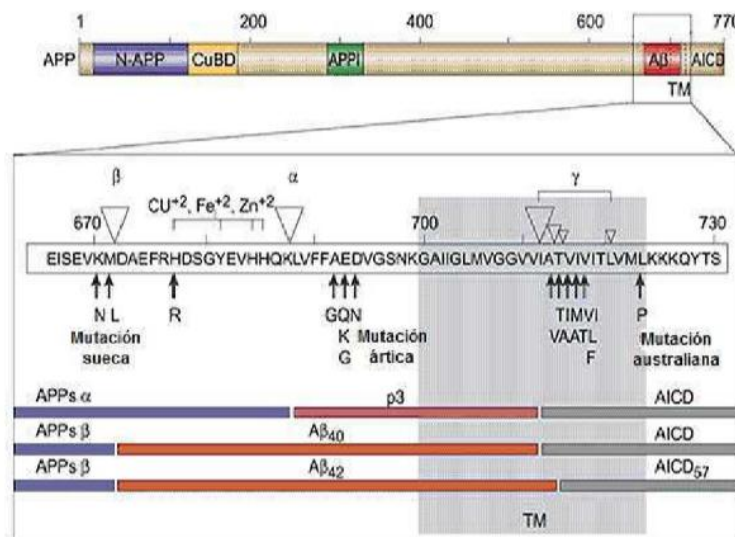


Figura 3 Proteína Precursora de amiloide(15)

En las neuronas, el APP se encuentra en vesículas en las terminales axonales, aunque no específicamente en las vesículas sinápticas. Durante y después de su tráfico por la vía secretoria, APP puede sufrir una cantidad de cortes proteolíticos para liberar derivados secretados en el lumen de vesículas y el espacio extracelular (16) El primer corte proteolítico identificado (ruta no amiloidogénica, Figura 7a), el realizado por una actividad designada α -secretasa, ocurre 12 aminoácidos amino (N-) terminal al dominio transmembrana de APP Este procesamiento resulta en la liberación de un fragmento de ectodominio grande y soluble (α -APPs) en el lumen o espacio extracelular y la retención de un fragmento de 83 residuos C-terminal (CTF) en la membrana. Diversas metaloproteinasas de zinc, como TACE/ADAM17, ADAM9, ADAM10 y MDC-9, y una aspartil proteasa, BACE2, pueden cortar APP en el sitio α -secretasa, que se localiza dentro del dominio A β , entre los residuos Lys16 y Leu17

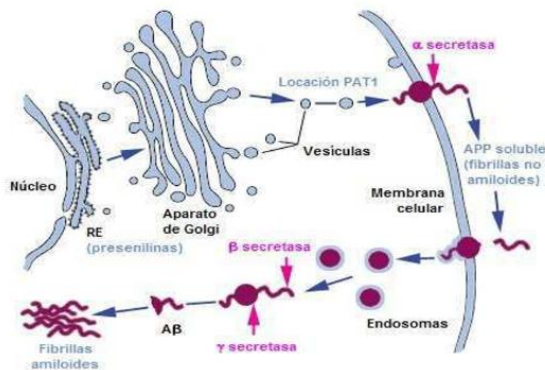


Figura 4 Tráfico intracelular de APP(17)

Alternativamente, algunas moléculas de APP que no han sido sujeto de corte α -secretasa pueden ser cortadas por una actividad designada β -secretasa (ruta amiloidogénica, Figura N° 4 que principalmente corta 16 residuos N-terminal al sitio de corte, generando un ectodominio derivado a penas menor (APPs) recíproco en la ruta de procesamiento amiloidogénica, y viceversa, conforme γ - y β - secretasas compiten por el sustrato APP (17). Debido a que el corte del fragmento C99 resultante de la actividad β -secretasa parecía ocurrir en el medio del dominio transmembranal, se asumió que ésto requeriría de la liberación de C99 de la membrana como resultado, por ejemplo, de alguna lesión preexistente en la membrana que permitió el acceso a la proteasa soluble. Sin embargo, el uso de anticuerpos sensibles para probar el medio condicionado de las células expresando APP reveló secreción de A que fue liberado constitutivamente de las células bajo condiciones normales. Este resultado sugirió que el corte por secretasa podía estar seguido por un corte constitutivo en el C-terminal de la región A, realizado por la β -secretasa. Al mismo tiempo se produce el fragmento p3 por acciones secuenciales de β - y α -secretasas

No se ha especificado aún dónde, durante su complejo tráfico intracelular, es que la APP sufre de los cortes por α -, β y γ -secretasas. Una porción de APPs se genera por la α -secretasa que actúa en la APP insertada en la membrana plasmática (Sisodia SS, 1992). Por otro lado, también se puede generar durante el tráfico secretorio intracelular de APP. El corte de la β -secretasa puede ocurrir, en parte, hacia finales del tráfico secretorio de APP. Desde el descubrimiento de APP se le han atribuido una variedad de papeles fisiológicos, algunos únicos a ciertas isoformas, pero su función real aún no se encuentra

clara. APP tiene funciones autócrinas y parácrinas en la regulación del crecimiento. Las formas de APP que contienen KPI encontradas en plaquetas humanas sirven como inhibidores del factor XIa, que es una proteasa de serina en la cascada de la coagulación (Smith RP et al., 1990). La función mejor establecida de APP es su papel trófico. Ha mostrado estimular el crecimiento de las neuritas, fenotipo compatible con el incremento de su expresión durante la maduración neuronal. Su dominio amino terminal de unión a heparina también estimula el crecimiento de las neuritas y promueve la sinaptogénesis.

4.2. β -Secretasa

La β -secretasa se conoce con el nombre de BACE1 (por sus siglas en inglés), ya que es la enzima I de corte de APP en el sitio, y es una aspartil proteasa. Aunque la mayoría de los tejidos del cuerpo exhiben actividad β -secretasa los niveles de actividad más altos se observan en el tejido neuronal y líneas celulares neurales. El nivel de actividad parece ser más bajo en astrocitos. Muy probablemente, la enzima es membranal o está asociada a una proteína de membrana. Se detecta mayor actividad a pH ácido aproximado de 4.5 (18), dentro de los compartimentos subcelulares de la vía secretoria, incluyendo TGN y endosomas BACE1 tiene una secuencia de 501 aminoácidos y dos sitios activos de proteasa de aspártico. Tiene una secuencia señal N-terminal (residuos 1-21) y un dominio propéptido (residuos 22-45) que se remueven postraduccionalmente, así que la enzima madura comienza en el residuo Glu46 (18). Se indica que la expresión de BACE1 está estrechamente regulada a nivel transcripcional y traduccional. El gen BACE1 abarca aproximadamente 30 kb en el cromosoma humano 11q23.2 e incluye 9 exones. Varios sitios de unión a factores de transcripción se activan en respuesta al estrés celular y, probablemente, influyen la actividad transcripcional del promotor.

BACE1 se sintetiza en el RE como una proteína precursora inmadura (proBACE1) de masa molecular aproximada a 60 kDa y vida corta, que madura a una forma de 70 kDa rápidamente en Golgi, lo que involucra la adición de carbohidratos complejos y la remoción del dominio propéptido. Presenta modificaciones postraduccionales extensivas. Las glicosilaciones parecen ser importantes para la actividad enzimática mientras que la palmitolización puede influenciar el tráfico y localización de la enzima

ProBACE1 puede cortar APP a inicios de su vía biosintética, llevando a la generación de un pool intracelular de A en el retículo endoplásmico (RE), el cual se piensa que es particularmente neurotóxico (Creemers JW et al., 2001). BACE1 madura se localiza ampliamente dentro de rafts de lípidos ricos en colesterol y reemplazar su dominio transmembranal con un glicosilfosfatidilinositol (GPI) dirige la enzima exclusivamente a los rafts de lípidos e incrementa sustancialmente la producción de A. Varios tipos de lípidos estimulan la actividad de BACE1 y su localización en el raft puede aumentarse por palmitolización. Es capaz de formar homodímeros que exhiben actividad catalítica incrementada.

El corte de APP por BACE1, que lleva a la transcripción genética mediada por el dominio intracelular de APP (AICD), puede ser importante para la función cognitiva. Se ha propuesto también un papel de BACE1 en el mantenimiento de la función sináptica.

4.3. Presenilinas

Las presenilinas 1 (cromosoma 14) y 2 (cromosoma 1) son proteínas de membrana, muy semejantes entre sí, constituidas por 467 y 448 aminoácidos, respectivamente; en ambos casos la cadena de aminoácidos atraviesa la membrana de 7 a 9 veces y, en el cerebro se localizan en el cuerpo de las neuronas y en las dendritas, excluyéndose los axones. Las presenilinas, forman parte del complejo γ -secretasa, siendo estas el componente catalítico activo, mientras que los otros componentes como la nicastrina, aph-1 (anterior pharynx defective 1) y pen-2 (presenilin-enhancer-2), median el ensamblaje del complejo y el reconocimiento del sustrato. Las presenilinas también juegan un papel en otras funciones celulares, incluyendo la regulación del calcio, el desarrollo de los axones y el transporte axonal, y se asocian con cambios bioquímicos en la sustancia blanca.

Las presenilinas también poseen actividades independientes del complejo γ secretasa, como la regulación de la vía de señalización WNT (son un grupo de vías de transducción de señales formadas por glicoproteínas que transfieren las señales del exterior de una célula a través de la superficie receptora de dicha célula hasta su interior) a través de la interacción con la β -catenina (proteína de la familia de las cateninas, es un componente esencial en la regulación transcripcional, sobre todo durante el período embrionario).

Mutaciones en esta vía conducen a gran variedad de enfermedades, incluyendo cáncer de mama y próstata, glioblastoma y diabetes de tipo II, entre otras patologías.

5. PEPTIDO BETA AMILOIDE ($A\beta$)

En 1984 se secuenció el péptido de 4 kDa de masa molecular conocido como β -amiloide¹⁴, además los investigadores afirmaron que el péptido β -amiloide podría ser derivado de un precursor único¹⁴. Posteriormente, en 1987, se produjo el descubrimiento de la APP¹⁵. Como hemos mencionado antes, el gen APP está localizado en el cromosoma 21 y codifica una proteína transmembranal que contiene un dominio extracelular grande, un dominio transmembrana hidrófobo y un dominio intracelular corto. La APP se sintetiza en el retículo endoplásmico, modificada en el aparato de Golgi y finalmente transportada a la superficie celular a través de la vía secretora. También es endocitada a partir de la superficie celular y metabolizada en la vía endosomal/lisosomal. La APP incluye un grupo heterogéneo de polipéptidos que provienen del splicing alternativo, el cual produce tres isoformas principales de APP (695, 751 y 770 residuos), y una variedad de modificaciones post-traduccionales. Las isoformas de empalme de APP que contienen 751 o 770 aminoácidos se expresan ampliamente en las células no neuronales, aunque también están presentes en las neuronas, en cambio, la isoforma de 695 aminoácidos se expresa en grandes cantidades en las neuronas y en menor número en células no neuronales.

Como se ha descrito, la APP puede sufrir una variedad de escisiones proteolíticas llevadas a cabo por enzimas o complejos enzimáticos con actividad α -, β - y γ -secretasa (Figura N° 5), que da lugar a la secreción de fragmentos grandes y solubles y de “C-Terminal Fragments” (CTF) asociados a la membrana. Las enzimas con actividad α -secretasa pertenecen a la familia ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase enzyme family), la actividad β -secretasa se ha identificado en el “ β -site APP-Cleaving Enzyme 1” (BACE1, proteína integral de membrana de tipo I que pertenece a la familia de la pepsina de las aspartilproteasas) y γ -secretasa es un complejo enzimático compuesto de la presenilina 1 o 2 (PSEN1 o PSEN2), nicastrina (NCSTN), “Anterior Pharynxdefective 1” (APH-1) y “Presenilin Enhancer 2” (PSENEN-2), y actúa en residuos dentro del dominio transmembrana.

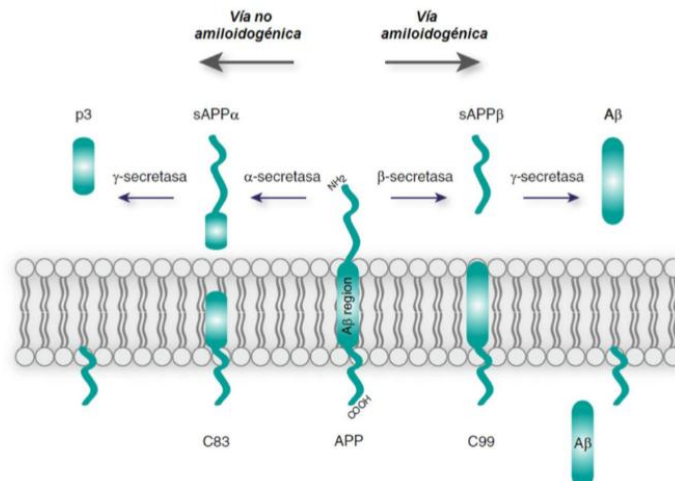


Figura 5 Representación esquemática del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP)(15)

Papel fisiológico de A β en la función sináptica

La observación de que el cerebro de un paciente con EA se caracteriza por la deposición extracelular de agregados insolubles del péptido A β apoya la idea de que los procesos patológicos eran responsables de la producción de este péptido de 4 kDa. Hace casi 20 años, este concepto se ha extendido por la observación de que el péptido A β también se produce en su forma soluble en condiciones normales durante el metabolismo celular. Las diferentes especies de A β (A β 40 y A β 42) están presentes en niveles bajos en el cerebro durante la vida, lo que sugiere que, en un estado saludable, A β desempeña funciones fisiológicas, que pueden ser diferentes cuantitativa o cualitativamente de sus efectos cuando los niveles están elevados durante condiciones de la enfermedad.

Estudios genéticos in vivo empleando modelos knock-outs y knock-in de la familia APP han demostrado el papel esencial de la familia APP para el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso periférico y central. En particular, destaca el papel en la formación de sinapsis, la liberación de transmisores, la plasticidad sináptica y el comportamiento²¹. Además, varios estudios indican que el procesamiento de APP y la presencia del péptido A β están asociadas con la actividad sináptica. Los fármacos que promueven un incremento de la actividad neuronal aumentan la producción de A β (tanto A β 40 y A β 42), mientras que los tratamientos farmacológicos que disminuyen la actividad neuronal reducen la acumulación de A β . Dado que los altos niveles de A β pueden interrumpir la función sináptica, es

interesante observar que el aumento de la actividad neuronal puede mejorar la producción de A β que, a su vez, deprime la función sináptica disminuyendo la actividad neuronal. En este contexto, el péptido A β podría tener una función de retroalimentación negativa para la prevención de la excitotoxicidad, es decir, podría prevenir la sobreactivación de receptores del neurotransmisor excitatorio de glutamato.

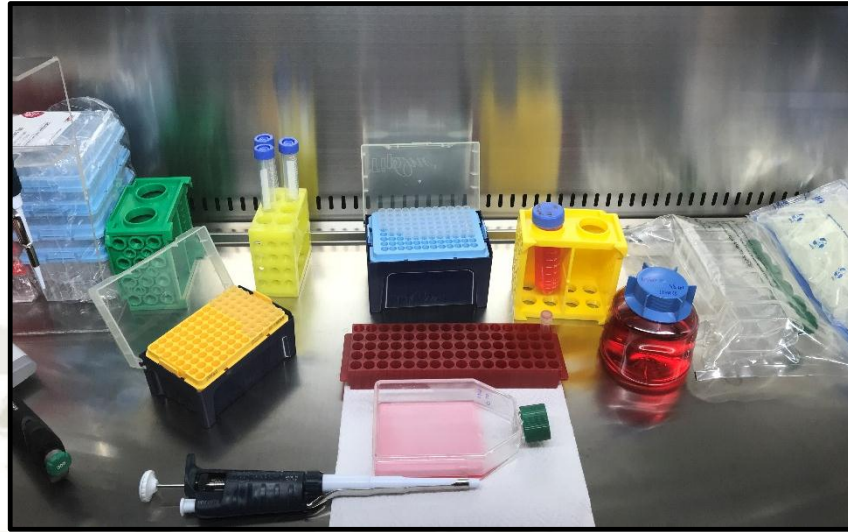
Como consecuencia de las funciones fisiológicas de A β , se ha demostrado que la inhibición de la producción de péptido A β induce la muerte celular. El tratamiento de células neuronales con inhibidores β - y γ secretasa reduce la viabilidad celular, mientras que la coincubación de A β 40 evita la toxicidad de estos inhibidores, lo que indica que la neurotoxicidad está estrictamente ligada a la producción de A β . Es interesante la observación de que diferentes tipos de células no-neuronales no muestran efecto cuando están sometidas a los mismos tratamientos.

6. CULTIVOS CELULARES

Actualmente las investigaciones se desarrollan en base al estudio de células específicas o grupos celulares en plantas y animales, por lo cual muchas investigaciones conducen a estudios sobre células aisladas que hoy en día se conoce como cultivo celular. (19)

Los cultivos celulares poseen diversas ventajas como la obtención de células de organismos de un único tipo específico con propiedades homogéneas, por otro lado, las condiciones experimentales pueden controlarse mejor en un cultivo que en un organismo intacto y por ultimo una única célula puede ser cultivada en un tiempo muy corto hasta formar una colonia de muchas células idénticas. (19)

Para desarrollar cultivos celulares es necesario tener en cuenta que estos varían de acuerdo al tipo de célula a cultivar, ya que en un medio artificial en el cual las células son cultivadas en un envase que debe contener un sustrato o medio que proporcione los nutrientes esenciales como aminoácidos, carbohidratos, vitaminas y minerales. Otros puntos a considerar son factores de crecimiento, hormonas y gases como O₂ o CO₂ y la regulación de las condiciones físico químicas como pH, presión osmótica y temperatura. (Figura N° 6).¹⁾

**Figura 6 Cultivo Celular.**

Fuente: Figura de fuente propia

6.1. ESTADOS DEL CULTIVO CELULAR

-Cultivo primario

El cultivo primario refiere al estado del cultivo después que las células son aisladas del tejido y proliferan bajo condiciones específicas. Para su preparación se deben romper las interacciones entre células y matriz, para ello los fragmentos de tejidos son tratados con una combinación de una proteasa (tripsina) y un quelante conocido (EDTA) que disminuye la presencia de iones metálicos como Ca^{2+} y Mg^{2+} del medio. Finalmente, las células liberadas son trasladadas en placas con un medio rico en nutrientes y suero, donde pueden adherirse entre sí a la superficie (20).

-Pasaje celular

Las células adherentes crecen en una mono capa hasta que tengan buena confluencia. La cinética del crecimiento celular in vitro presenta una etapa de latencia, fase de crecimiento exponencial y finalmente la fase de estado estacionario en la que prácticamente no hay crecimiento y la cantidad se hace constante. En este estado a estas las células se les puede agregar tripsina y reintroducirlos en medios nuevos a este proceso se le denomina pasaje celular o subcultivo (20)

-Línea celular

Después del primer pasaje el cultivo primario comienza a ser conocido como línea celular o subclon. Las líneas celulares derivadas de cultivos primarios tienen una vida limitada (20).¹⁾

7. CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

Las células neuroblastomas SH-SY5Y son un subclon de la línea celular neuroblastoma parental SK-N-SH. Esta línea celular parental fue generada en 1970 a partir de una biopsia de medula ósea. Las células neuroblastoma SH-SY5Y presentan un cariotipo estable que consta de 47 cromosomas. Esta línea celular se ha usado ampliamente como modelo de neuronas desde principios de la década de 1980, debido a que estas células poseen muchas propiedades bioquímicas y funcionales de las neuronas. Esta línea celular presenta actividad neuronal enzimática (tirosina y dopamina- β -hidroxilasas), captación específica de noradrenalina y expresa uno o más proteínas de neurofilamentos; estas células también expresan receptores opioides, muscarínicos y de factor de crecimiento nervioso. ⁽³²⁾ Las células neuroblastoma SH-SY5Y poseen la capacidad de proliferar en cultivo durante largos períodos sin contaminación, un prerrequisito para el desarrollo de un modelo celular in vitro. En consecuencia, la línea celular SH-SY5Y se ha utilizado ampliamente en estudios neurológicos experimentales, incluyendo el análisis de diferenciación neuronal, metabolismo, función relacionada con neurodegeneración y procesos neuroadaptativos, neurotoxicidad, y neuroprotección (20).

CAPITULO II

1. MATERIALES Y METODOS

1.1. UBICACIÓN GEOGRAFICA DEL ESTUDIO

El estudio en su totalidad fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular y Farmacología Experimental (H-401), perteneciente a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María de Arequipa.

Para desarrollar el presente trabajo de investigación, las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, fueron procesadas desde la primera generación las cuales fueron incubadas a condiciones de 37°C y 5% de CO₂. Dichas células fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's médium) completo, con 10% de FBS (suero bovino fetal), 50 UI/mL de penicilina, y 50 µg/mL de estreptomicina.

2. EXTRACTOS DE MACA

EXTRACTO PENTANICO DE *Lepidium meyenii* L.

Los extractos de maca para realizar los experimentos detallados en este trabajo, fueron obtenidos del laboratorio "PROYECTO MERCURIO", de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María.

3. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

3.1. Material Biológico

- ✓ *Lepidium meyenii* "maca"
- ✓ *Lepidium meyenii* "maca"
- ✓ Línea celular SH-SY5Y (ATCC)

3.2. Materiales de Laboratorio

- ✓ Pipetas de 1, 5 y 10 mL
- ✓ Matraces Erlenmeyer 50 y 100 mL
- ✓ Probeta 100 mL y 1000 mL
- ✓ Fiolas de 10, 25 y 50 mL
- ✓ Frascos de cultivo celular de 25 cm² (Sigma-Aldrich)
- ✓ Placa de cultivo de 96 pocillos (Falcon)
- ✓ Viales
- ✓ Tubos FALCON de 15ML.
- ✓ Tubos Eppendorf
- ✓ Parafilm
- ✓ Pipeta automática multicanal 0.5 µL a 10 µL
- ✓ Pipeta automática multicanal 20 µL a 100 µL
- ✓ Pipeta automática multicanal 20 µL a 200 µL
- ✓ Pipeta automática multicanal 200 µL a 1000 µL
- ✓ Pipetas de plástico descartable 10 mL, 25 mL (Falcon)
- ✓ Pipeteador automático (Boeco)
- ✓ Placas de 96 pozos para qPCR
- ✓ Film adhesivo para placas de qPCR
- ✓ Tips estériles para micropipetas de 1000, 200 y 20 µL
- ✓ Racks para tubos falcon, tubos de 1.5 mL y 200 µL
- ✓ Placas de cultivo celular de 96 pozos

3.3. Equipos

- ✓ Cámara de Bioseguridad Clase II tipo A2 (Labculture XL200)
- ✓ Cabina de Seguridad para PCR
- ✓ Incubadora de CO₂ (THERMO SCIENTIFIC)
- ✓ Centrifuga para tubos falcon de 15mL (DYNAC)
- ✓ Centrifuga refrigerada para tubos eppendorf de 2.0mL (DYNAC)
- ✓ Termociclador para PCR en tiempo real
- ✓ Equipo para Electyroforesis tipo submarino (Bio-Rad)
- ✓ Transiluninador UV ()
- ✓ Vortex
- ✓ Microscopio Invertido (CarlZeeiss)
- ✓ Multi Lector de placas (VarioscanLux, THERMO SCIENTIFIC)
- ✓ Fluorómetro Qubit 2.0
- ✓ Microcentrifuga, Mini spin
- ✓ Microondas

3.4. Reactivos

- ✓ Suero bovino fetal (SBF)
- ✓ Dimetilsulfóxido
- ✓ PBS (buffer fosfato salino)
- ✓ Penicilina
- ✓ Etanol 96° y 70°

- ✓ Agarosa ultrapura grado biología molecular
- ✓ Agua libre de DNAsas y RNAsas, grado biología molecular
- ✓ Buffer tris-acetato-EDTA 50x (TAE)
- ✓ Cebadores u oligonucleótidos
- ✓ Buffer de carga (Loading dye)
- ✓ Agente intercalante de ADN (SybrSafe y RunSAFE)

3.5. Kits

- Qubit dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen)
- Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen)
- OneScript cDNA Synthesis Kit (Applied Biological Materials, abm)
- innuMIX qPCR SyGreen Sensitive (analytikjena).

4. METODOLOGIA

4.1. Preparación de medio de cultivo celular Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM)

El medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) líquido fue suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1X de Antibiótico Antimicótico (ampicilina 104 unidades/mL, estreptomicina 104 ug/mL, anfotericina 25 ug/mL) Figura N° 7, para un volumen total de 1000 mL de medio completo suplementado con 100 mL de suero bovino fetal y 100 uL de Antibiótico Antimicótico 100X con 11.57 mL de medio DMEM incompleto. Se guardaron alícuotas de medio DMEM e tubos Falcon de 50ml a temperatura de 4°C.



Figura 7 Reactivos que componen el medio completo DMEM, Suero Fetal Bovino, Tripsina, Antibiótico y antimicótico.

Fuente: Figura de fuente propia

4.2. Cultivo de Células de Neuroblastoma

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y(ATCC) fueron obtenidas de la Universidad de Massachusetts College of Pharmacy and Health Science (MCPHS) de los Estados Unidos de América. Las células fueron acondicionadas y posteriormente se cultivaron desde su primera generación, el protocolo que se siguió se describe a continuación: Se tomó 1 mL del vial original que contenía células resuspendidas y se transfirió a un frasco para cultivo celular, se añadió medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) el cual fue enriquecido con 10 % FBS y antibiótico y antimicótico hasta un volumen de 5 mL, luego se dejó a condiciones de 37°C y una atmosfera de 5 % de CO₂ en una Incubadora. Se esperó aproximadamente 5 a 7 días para poder obtener la primera generación, a continuación, se describe el procedimiento para la generación de un nuevo pasaje celular:

- Desechar el medio de los flacks de incubación.
- Agregar 10 mL de Tripsina-EDTA a cada flacks, 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
- Mezclar agitando el flacks

- Transferir el contenido del a tubos de 15 mL
- Centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos.
- Eliminar el sobrenadante y quedarse con el precipitado
- Resuspender el pellet en medio DMEM completo y proceder a sembrar en flacks ó placas de 96 pozos según corresponda el análisis a realizar.

Acondionadas las células SH-SY5Y, se procedió con su separación del frasco de cultivo de 75ml, luego se desechó el medio y se adicono 3 ml de tripsina, la tripsina debe actuar despegando las células adheridas, todas las acciones hechas se realizaron en la cabina de Bioseguridad, por último, se llevó las células a la incubadora por 5 minutos a 37°C.

Finalizado el tiempo de incubación, la suspensión fue recolectada en un tubo eppendorf y fueron llevadas a centrifugación a 1000 rpm por 5 minutos.

Una vez culminada la centrifugación, la formación de un precipitado celular (pellet), será indicativo de la obtención de células SH-SY5Y, se eliminó el sobrenadante cuidadosamente asegurándose que el pellet celular no se desintegre. Posteriormente se volvió a resuspender el pellet en medio DMEM enriquecido con SFB y se homogenizo la suspensión tratando que sea uniforme.

4.3. Conteo y Viabilidad de las Células SH-SY5Y de neuroblastoma humano

Acondionadas las células, es necesario contabilizar la cantidad de células y determinar el porcentaje de viabilidad celular (Figura N° 8). Se empleó el kit Muse™ Count & Viability Kit (MERCK), el proceso de conteo y viabilidad de las células de Neuroblastoma Humano SH-SY5Y se siguió de acuerdo a las recomendaciones del proveedor (21).

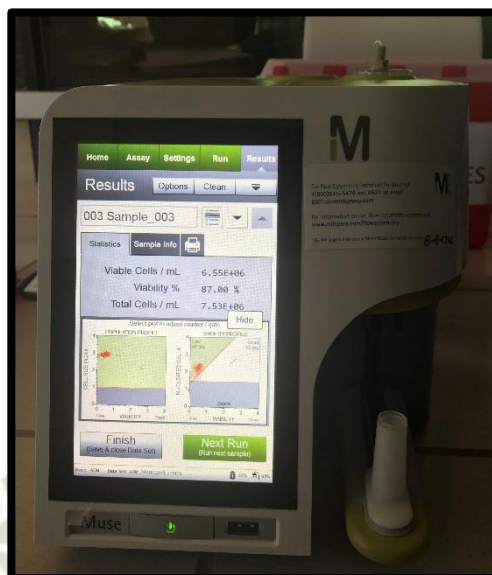


Figura 8 . Cuantificación del número de células y Viabilidad celular.

Fuente: Figura de fuente propia

Preparación del péptido Beta Amiloide (β -A)

Se empleó el péptido sintético Beta Amiloide (β -A) (rPEPTIDE), dicho péptido presenta un 95% de pureza y este compuesto de la siguiente cadena peptídica: G S N K G A I I G L M, se pesó 1mg de β -A y se disolvió en 1mL de Agua estéril grado biología molecular, llevándolo a una concentración de 1000uM, la cual fue colocada en medio de cultivo DMEM 5% para obtener una concentración de 10uM. Seguidamente se preparó 05 concentraciones diferentes de maca las cuales fueron de 0.1uM, 0.5uM, 1uM, 5uM, 10uM.

4.4. Preparación de las Muestras de 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 ug/mL. a partir de esta solución se preparó la concentración de 100ug/mL, para ello se tomó 2uL de la solución stock de 10000ug/ml y fue diluida en 198uL de DMSO. Las nuevas concentraciones de 0.1, 0.5; 1; 10;50 ug/mL, serán

colocadas en cada pozo de la placa de 96. Se trabajó de esta manera con las tres variedades de maca.

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

4.5. Exposición de las Células de Neuroblastoma SH-SY5Y al Péptido β -Amiloide y Expresión Genética de APP, BACE1 y PSEN1.

Células diferenciadas y en confluencia fueron cultivadas en placas de 96 pozos de polipropileno, para este ensayo se emplearon 06 pozos en donde se cultivó 3×10^4 células /pozo en 200uL de medio completo DMEM, se dejó a incubación (37°C y 5% CO_2) por 24 a 48 horas, tiempo suficiente para que las células sembradas logren adherirse a la placa y alcancen su mayor confluencia y diferenciación, seguidamente se añadió en cada pozo β -Amiloide con diferentes concentraciones (0.1uM, 0.5uM, 1uM, 5uM, 10uM) y se incubo por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 .

Luego de la incubación de las células expuestas a 5 concentraciones del péptido, se procedió a lavar las células de cada pozo con medio de cultivo incompleto DMEM, seguidamente se procedió a despegar las células de la placa, se empleó el método descrito en el ANEXO 1.

4.6. Extracción de ARN total a partir de células de neuroblastoma humano, expuestas a 05 concentraciones diferentes de β -Amiloide

La extracción del ARN total de células SH-SY5Y de neuroblastoma expuestas al péptido β -Amiloide, se realizó con el método de TRIZOL – Alcohol Isoámilico, la metodología empleada sigue las instrucciones descritas en el ANEXO 2. La extracción del material genético de 06 muestras de RNA fueron realizadas bajo condiciones de esterilidad, tomando todas las medidas de bioseguridad correspondientes ya que, al ser un material genético poco estable, puede degradarse durante el proceso, Finalmente las muestras obtenidas fueron rotuladas aleatoriamente y almacenadas a -20°C hasta su proceso.

4.7. Evaluación de la integridad y calidad del ARN de células SH-SY5Y

Las muestras de ARN fueron evaluadas mediante electroforesis de tipo submarino, empleando un gel de agarosa (1%) esto con el fin de identificar las regiones ribosomales del ARN eucariota (28S, 18S) (59). Para la preparación del gel de agarosa, se pesó 0.15 g de agarosa y se mezcló con 15 mL de buffer TAE 1X, luego se procedió a calentar la mezcla. La mezcla fue añadida en el molde para geles, donde se colocó un peine para la formación de pozos. Se preparó 8 μ L de muestra (ARN) con 2 μ L de RunSafe y fueron depositados en los pozos del gel de agarosa. Para iniciar la electroforesis del ARN, se añadió a la cámara 400ml de buffer TAE 0,5X, la corrida electroforética se realizó administrando 80 V por 30 minutos. Las bandas fueron reveladas exponiendo el gel de agarosa en un transiluminador (luz UV).

La calidad del material genético se evaluó empleando también espectrofotometría. Para este análisis se midió la absorbancia de cada ARN extraído en el espectrofotómetro multiparámetro Varioskan Lux (Thermo Scientific). Se realizó una dilución 1:10 del ARN con agua grado biología molecular y se midió en placas de 96 pozos a las longitudes de onda 230 nm, 260 nm y 280 nm.

4.8. Cuantificación de la concentración de ARN total de células SH-SY5Y.

La evaluación de la concentración de las muestras de ARN se realizó por fluorometría utilizando el kit Qubit RNA HS Assay Kit y 2 μ L de ARN extraído como muestra. Los procedimientos de cuantificación incluyeron la medición de dos estándares de ARN que vienen incluidos en el kit. Una solución de trabajo (working solution) fue preparada diluyendo el reactivo Qubit RNA HS Reagent con el reactivo Qubit RNA HS Buffer (1:200) para cada muestra y estándar. Para la cuantificación de los estándares, se mezcló en un tubo 190 μ L de solución de trabajo con 10 μ L de cada estándar y para las muestras 198 μ L de solución de trabajo con 2 μ L de ARN extraído. Cada tubo se mezcló homogéneamente y se incubó en oscuridad, a temperatura ambiente durante 2 minutos y se procedió a leer en el fluorómetro Qubit 2.0. (Figura N° 9)



Lectura en el fluorómetro Qubit
2.0

Figura 9 Medición de la concentración de RNA.

Fuente: Figura de fuente propia

4.9. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis de ADNc a partir de ARN total, se empleó el kit OneScript cDNA Synthesis Kit (Applied Biological Materials, abm) (Figura N° 10) de acuerdo a las instrucciones del fabricante(22). La cantidad de ARN empleado para cada reacción fue 2.5 ng y se calculó para cada muestra según los datos de la cuantificación de concentración del ARN. El ADNc sintetizado fue almacenado a -20°C hasta su proceso.



Figura 10 Kit para la síntesis de ADNc, OneScript cDNA Synthesis Kit (Applied Biological Materials, abm).

Fuente: Figura de fuente propia

4.10. Cuantificación del ADNc obtenido por fluorimetría.

La cuantificación se realizó por fluorimetría utilizando el Qubit dsDNA BR Assay Kit y 1 μL de ADNc sintetizado, para dicho ensayo se siguieron los siguientes pasos: Se midieron dos estándares de ADN que se incluyen en el kit. Se preparó una solución de trabajo (working solution) diluyendo el reactivo Qubit dsDNA BR Reagent con el Qubit dsDNA BR Buffer (1:200) por cada muestra y estándar. Para cuantificar los estándares se mezcló en un tubo 190 μL de solución de trabajo con 10 μL de cada estándar y para las muestras 199 μL de solución de trabajo con 1 μL de ADN extraído. Cada tubo se agitó, se incubó en oscuridad, a temperatura ambiente durante 2 minutos y se leyó en el fluorómetro Qubit 2.0.

4.11. Medición de la expresión relativa de los genes APP, PSEN1 y BACE1 por qPCR

Se procedió a la amplificación y expresión genética del ADNc de las muestras que provinieron de los 6 pozos con células SH-SY5Y, empleando la técnica molecular qPCR, con la ayuda de cebadores específicos para cada gen de interés (Figura N° 11) y moléculas fluorescentes como el SYBRGreen. El kit empleado para la preparación del Mix de PCR fue el innuMIX qPCR SyGreen Sensitive (analytikjena). Se empleó la cuantificación del tipo relativa, para ello se analizaron los genes APP, BACE1 y PSEN1(23), además de la amplificación de dichos genes, se amplificó también en la misma reacción el gen de referencia, Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), gen caracterizado por su expresión constante y que es considerado un Gen de Referencia(Housekeeping). La secuencia de los cebadores empleados se muestra en la Tabla N°3:

Tabla 3. Secuencias de los cebadores o cebadores utilizados para realizar la PCR tiempo real (qPCR) de los genes APP, PSEN1, BACE1 y gen de referencia GAPDH.

Primer	Secuencia
APP F	5'-TGGCCAACATGATTAGTGAACC-3'
APP R	5'-AAGATGGCATGAGAGCATCGT-3'
BACE1 F	5'-GGGCTGGCCTATGCTGAGATTGC-3'
BACE1 R	5'-GCACCAACAAAGCTGCAGGGAGAA-3'
PSEN1 F	5'-GCGGCGGGGAAGCGTATAACC-3'
PSEN1 R	5'-GGCCAAGCTGTCTAAGGACCGC-3'
GAPDH F	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH R	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'



Figura 11 Oligonucleótidos (primers) empleados en la expresión génica, APP, PSEN1, BACE1 y GAPDH

Fuente: Figura de fuente propia

La concentración final de cada cebador y los protocolos de amplificación se señala en la TABLA N° 7,8 y 9, para un volumen final de reacción de 20 μ L. La preparación del mix de reacción para qPCR se preparó en la cabina de seguridad para PCR (Figura N° 12), antes de iniciar el proceso de mezcla, se procedió a esterilizar el área de trabajo durante 15 minutos exponiéndolo a luz UV, pasado el tiempo de esterilización se procedió a preparar el Mix de qPCR y repartirlo en placas de 96 pozos estériles. El ADNc se añadió fuera de la cabina de seguridad para evitar contaminación de la cabina por Amplicones de ADNc, los volúmenes y concentraciones empleados en dicho análisis para cada gen, se muestran por separado en las tablas TABLA N° 4, 5 y 6. Luego se colocaron las muestras en el Termociclador para tiempo real y se programó los protocolos de amplificación correspondiente a los genes analizados(65).



Figura 12 ° Preparación del Mix para qPCR en cabina estéril.

Fuente: Figura de fuente propia

Tabla 4 Preparación del mix de reacción para realizar la cuantificación genética de APP por qPCR.

	M1 (0.1uM)	M2 (0.5uM)	M3 (1 uM)	M4 (5uM)	M5 (10uM)	Blanco
Master Mix SYBRGreen	10uL	10uL	10uL	10uL	10uL	10uL
Primer Forward APP (250nM)	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL
Primer Reverse APP (250nM)	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL
ADNc	02uL	02uL	02uL	02uL	02uL	0
Agua Estéril	06uL	06uL	06uL	06uL	06uL	8uL
Volumen Total	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL

Tabla 5 Preparación del mix de reacción para realizar la cuantificación genética de PSEN1 por qPCR.

	M1 (0.1uM)	M2 (0.5uM)	M3 (1 uM)	M4 (5uM)	M5 (10uM)	Blanco
Master Mix SYBRGreen	10uL	10uL	10uL	10uL	10uL	10uL
Primer Forward PSEN1 (250nM)	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL
Primer Reverse PSEN1 (250nM)	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL
ADNc	02uL	02uL	02uL	02uL	02uL	0
Agua Estéril	06uL	06uL	06uL	06uL	06uL	8uL
Volumen Total	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL

Tabla 6 Preparación del mix de reacción para realizar la cuantificación genética de BACE1 por qPCR.

	M1 (0.1uM)	M2 (0.5uM)	M3 (1 uM)	M4 (5uM)	M5 (10uM)	Blanco
Super Mix SYBRGreen	10u 1	10u 1	10u 1	10u 1	10u 1	10u 1
Primer Forward BACE1 (250nM)	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL
Primer Reverse BACE1 (250nM)	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL	01uL
ADNc	02uL	02uL	02uL	02uL	02uL	0
Agua Estéril	06uL	06uL	06uL	06uL	06uL	8uL
Volumen Total	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL	20uL

Las muestras fueron analizadas en triplicado, los protocolos para los 03 genes analizados fueron independientes entre sí, cada gen presenta un protocolo de amplificación distinto lo que aseguro su análisis correcto y específico.

Tabla 7 Concentración final de los cebadores y protocolo de amplificación para el gen APP y el gen de referencia GAPDH.

Gen	Concentración final de los cebadores	Protocolo de amplificación		
BACE1	250 nM	95°C	5 min	
		95°C	30 s	
		57°C	30 s	40 ciclos
		72°C	20 s	
GAPDH	250 nM	95°C	5 min	
		95°C	30 s	
		57°C	30 s	40 ciclos
		72°C	20 s	

Tabla 8 Concentración final de los cebadores y protocolo de amplificación para el gen BACE1 y el gen de referencia GAPDH

Gen	Concentración final de los cebadores	Protocolo de amplificación genética		
APP	250 nM	95°C	5 min	
		95°C	30 s	
		57°C	30 s	40 ciclos
		72°C	20 s	
GAPDH	250 nM	95°C	5 min	
		95°C	30 s	
		57°C	30 s	40 ciclos
		72°C	20 s	

Tabla 9 Concentración final de los cebadores y protocolo de amplificación para el gen PSEN1 y el gen de referencia GAPDH

Gen	Concentración final de los cebadores	Protocolo de amplificación		
PSEN1	250 nM	95°C	5 min	
		95°C	15 s	
		64.7°	30 s	40 ciclos
		72°C	30 s	
GAPDH	250 nM	95°C	5 min	
		95°C	15 s	
		58.5°C	30 s	40 ciclos
		72°C	30 s	

Para el análisis Post-PCR de la expresión genética se empleó la técnica del Pfaffl ($\Delta\Delta(C_t)$), técnica por la cual se evaluará la expresión genética de los 03 genes implicados en este trabajo, la técnica compara las diferencias entre los Ciclos Umbral del gen de referencia (GAPDH) y el gen problema (APP, PSEN1 y BACE1). Dicho análisis emplea la siguiente fórmula:

$$R = 2^{-[\Delta CP_{muestra} - \Delta CP_{control}]}$$

$$R = 2^{-\Delta\Delta CP}$$

4.12. Exposición de las Células de Neuroblastoma SH-SY5Y a *Lepidium meyeri*

Así también se descongelaron células de neuroblastoma crio preservadas a -180°C , empleando el protocolo de Descongelamiento de Células indicado en el ANEXO 3 Las células luego de ser descongeladas fueron cultivadas en placas de 96 pozos de

polipropileno, en este ensayo se empleó 06 pozos, se han analizado 03 ecotipos de maca; Maca Roja (MR), Maca Negra (MN) y Maca Amarilla(MA). En una primera etapa se ha cultivado 3×10^4 células /pozo en 200uL de medio completo DMEM, se dejó a incubación (37°C y $5\% \text{ CO}_2$) por 24 a 48 horas, tiempo suficiente para que las células sembradas logren adherirse a la placa y alcancen su mayor confluencia y diferenciación. Pasadas las 24 a 48 horas, se colocó 05 concentraciones diferentes de cada ecotipo de maca 0.5ug/mL, 1 ug/mL, 10 ug/mL, 25 ug/mL y 50 ug/mL, se distribuyó 3 columnas de 6 pozos cada una, dichas columnas estuvieron rotuladas para los ecotipos de Maca Roja, Negra y Amarilla, y se incubo por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 .

Luego de incubar las células expuestas a 5 concentraciones distintas de 3 ecotipos de maca, se procedió a retirar el medio de cultivo y se lavaron las células de cada pozo con medio de cultivo incompleto DMEM, seguidamente se procedió a despegar las células de la placa, para dicho procedimiento se siguieron las indicaciones del protocolo descrito en el ANEXO 1.

La extracción de RNA total de las células tratadas con maca, la medición y evaluación de la Concentración y Calidad e Integridad del material genético siguen el mismo procedimiento descrito anteriormente (puntos 3.6.1, 3.6.2, 3.6.3,3.6.4, 3.6.5), así como también siguiendo los procedimientos en el ANEXO 2.

4.13. Medición de la expresión relativa de los genes APP, PSEN1 y BACE1 por qPCR

En cuanto a la evaluación de la amplificación y expresión genética del ADNc de las células cultivadas en 18 pozos y expuestas a 5 concentraciones diferentes de 3 ecotipos de maca. Se empleó la técnica de amplificación molecular qPCR, con la ayuda de cebadores específicos (secuencias mostradas anteriormente en las TABLA N°3) que reconocen secuencias nucleotídica específicas de los genes APP, PSEN1 y BACE1, genes de interés en este estudio. La cuantificación genética que se siguió fue del tipo relativa para lo cual se empleó el gen de referencia GAPDH y se utilizó la tecnología de las moléculas fluorescentes SYBRGreen. El kit empleado para la preparación del Mix de PCR fue el innuMIX qPCR SyGreen Sensitive (analytikjena) (Figura N° 13). Las muestras preparadas en la cabina estéril de PCR, fueron codificadas y fueron llevadas a placas de polipropileno (96 pozos) especiales para qPCR la placa fue colocada en el

Termociclador para PCR en tiempo real (RealPlex, EPPENDORF), donde se configuró el protocolo de corrida, se digito las muestras que serían procesadas y se procedió a dar inicio a la amplificación y evaluación de la expresión génica (Figura N° 14)



Figura 13 Colorante Fluorescente SYBRGreen, empleado para cuantificar la expresión génica de APP, PSEN1 y BACE1.

Fuente: Figura de fuente propia

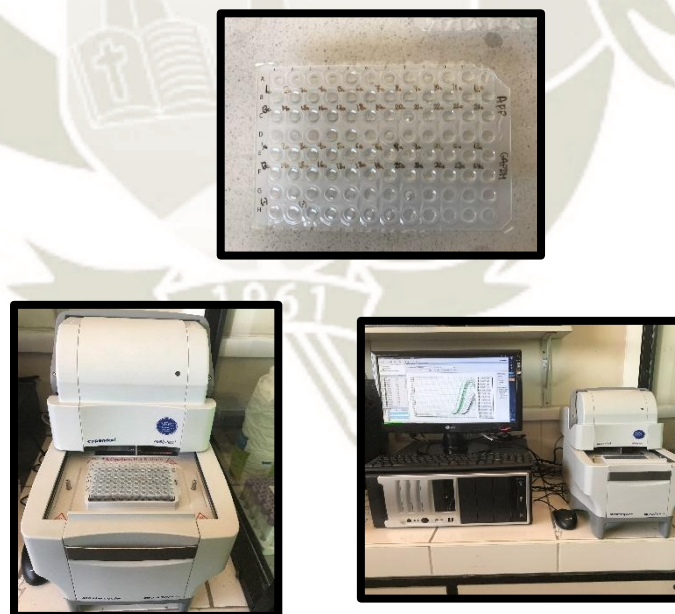


Figura 14 Preparación de las muestras para evaluar expresión, génica empleando el equipo RealPlex EPPENDORF.

Fuente: Figura de fuente propia

4.14. Efecto Neuroprotector de 3 Ecotipos de Maca (Amarilla, Negra y Roja) en células de Neuroblastoma SH-SY5Y estresadas con el péptido β -Amiloide

Con el fin de evaluar el efecto Neuroprotector que podría tener *Lepidium meyenii*, se probaron 03 ecotipos de maca (Amarilla, Negra y Roja).

Se procedió a descongelar células para iniciar los ensayos, se retiró 03 crioviales crio preservados a -180°C , se llevó a baño maría (37°C) las células y luego se procedió a repartirlas en flacks añadiéndoles 5mL de medio específico DMEM, este procedimiento se realizó en cabina de bioseguridad tomando las medidas necesarias de bioseguridad. Se dejaron las células cultivadas a condiciones 37°C y 5% CO_2 por un tiempo de 48 horas, hasta que se acondicionen, entren en confluencia y se logren diferenciar.

Posteriormente se realizó el despegue celular de los flacks previo análisis en el microscopio de fluorescencia invertido en el cual se pudo evidenciar la confluencia y diferenciación de las células de neuroblastoma. Se siguió el protocolo descrito en el ANEXO 1, se procedió seguidamente a cultivar las células en las placas de 96 pozos, el número cultivado fue de 3×10^4 células /pozo en 200uL de medio completo DMEM, se dejó a incubación (37°C y 5% CO_2) por 24 horas.

4.14.1. Preparación de muestras para evaluar el efecto neuroprotector de 3 ecotipos de maca sobre células de neuroblastoma humano expuestas al péptido β -Amiloide (0.5uM)

Pasadas las 24 horas de acondicionamiento celular, se preparó 18 pozos divididos en 3 grupos, cada grupo representa un ecotipo de maca, en el siguiente cuadro se resume los tratamientos preparados por ecotipo de maca (Tabla N°10), a células de neuroblastoma se añadió 2 concentraciones de maca (amarilla, negra y roja) 0.5ug/mL y 10ug/mL, los procedimientos se realizaron en condiciones estériles en la cabina de bioseguridad.

Ecotipo Maca Amarilla	Ecotipo Maca Negra	Ecotipo Maca Roja
Células + B-A + Maca Amarilla 0.5ug/mL	Células + B-A + Maca Negra 0.5ug/mL	Células + B-A + Maca Roja 0.5ug/mL
Células + B-A + Maca Amarilla 1ug/mL	Células + B-A + Maca Negra 1ug/mL	Células + B-A + Maca Roja 1ug/mL
Células + B-A + Maca Amarilla 10ug/mL	Células + B-A + Maca Negra 10ug/mL	Células + B-A + Maca Roja 10ug/mL
Células + B-A + Maca Amarilla 25ug/mL	Células + B-A + Maca Negra 25ug/mL	Células + B-A + Maca Roja 25ug/mL
Células + B-A + Maca Amarilla 50ug/mL	Células + B-A + Maca Negra 50ug/mL	Células + B-A + Maca Roja 50ug/mL
Blanco	Blanco	Blanco

Tabla

10

Muestras preparadas con Células SH-SY5Y, β -Amiloide (5uM) y 2 concentraciones de 3 ecotipos de maca.

Los tratamientos con extractos de 3 ecotipos de maca fueron dejados en incubación por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ con el fin de que los extractos mencionados tengan efecto Neuroprotector sobre las células SH-SY5Y.

Al termino de las 24 horas de incubación, se añadió a los 21 pozos tratados con maca amarilla, negra y roja, el péptido β -Amiloide (0.5 uM) y dejado a incubación por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂.

4.15. Preparación de 3 ecotipos de maca sobre células de neuroblastoma humano como Co-Tratamientos expuestas al péptido β -Amiloide (0.5uM)

Así también se evaluó el efecto como Co-Tratamiento que podrían tener los diferentes ecotipos de maca que se han probado en este estudio. Luego de las 24 horas de acondicionamiento celular, se logró preparar 21 pozos divididos en 3 grupos, cada grupo representa un ecotipo de maca, en el ANEXO 4 se resume los tratamientos preparados

por ecotipo de maca. Células de neuroblastoma se añadieron en una primera etapa, 2 concentraciones de maca (amarilla, negra y roja) 0.5ug/mL y 10ug/mL, los procedimientos se realizaron en condiciones estériles en la cabina de bioseguridad.

Los extractos de 3 ecotipos de maca fueron dejados en incubación con las células de neuroblastoma por 48 horas a 37°C y 5% de CO₂ con el fin de que los extractos mencionados ejerzan efecto Neuroprotector sobre las células SH-SY5Y.

En una segunda etapa (al termino de las 48 horas), se añadió a los 21 pozos tratados con maca amarilla, negra y roja, nuevamente 2 concentraciones de maca iguales a las que utilizo en la primera etapa, esta vez acompañadas del péptido β -Amiloide (0.5 uM) y dejado a incubación por 48 horas más a 37°C y 5% de CO₂.

4.16. Extracción del ARN total, cuantificación de la concentración, calidad e integridad del material genético, síntesis del ADNc y medición de la expresión genética de APP, BACE1 y PSEN1 en células de neuroblastoma humano.

Los ensayos de medición de la concentración del ARN total, la medición de la calidad e integridad del material genético, la síntesis del ADNc y la medición de la expresión genética de APP, BACE1 y PSEN1 han seguido el mismo procedimiento descrito anteriormente.

4.17. Efecto Neuroprotector de N benciloctadecadienamida en células de Neuroblastoma SH-SY5Y estresadas con el péptido β -Amiloide

Se ha trabajado también con el **N benciloctadecadienamida** que es una macamida sintética la cual podría tener efecto Neuroprotector sobre células SH-SY5Y de neuroblastoma humano y su relación con la expresión genética de los genes APP, BACE1 y PSEN1 cuando estos son estresados con el péptido β -amiloide, en este análisis nos ayudó a conocer el efecto de una Macamida sintética (N benciloctadienildecadienamida.)

Se trabajó con células ya diferenciadas y en confluencia las cuales se encontraban cultivadas en flacks de 15mL. Posteriormente se realizó el despegue celular de los flacks

previo análisis en el microscopio de fluorescencia invertido en el cual se pudo evidenciar la confluencia y diferenciación de las células de neuroblastoma. Se siguió el protocolo descrito en el ANEXO 1, se procedió a cultivar las células en placas de 96 pozos, el número cultivado fue de 3×10^4 células /pozo en 200uL de medio completo DMEM, se dejó a incubación (37°C y 5% CO_2) por 24 horas.

4.17.1. Acción de macamida sintética sobre células de neuroblastoma humano como Co-Tratamientos expuestas al péptido β -Amiloide (0.5uM)

Así también se evaluó el efecto como Co-Tratamiento que podría tener el **N bencil-benciloctadecadienamida (M75)**. Luego de las 24 horas de acondicionamiento celular, se logró preparar 16 pozos divididos en 2 grupos, cada grupo representa una concentración de macamida sintética, en el ANEXO 5, se resume los tratamientos preparados con N benciloctadecadienamida, a células de neuroblastoma se añadió en una primera etapa, 2 concentraciones M75 0.5ug/mL y 10ug/mL, los procedimientos se realizaron en condiciones estériles en la cabina de bioseguridad.

Las concentraciones de M75 fueron dejados en incubación con las células de neuroblastoma por 48 horas a 37°C y 5% de CO_2 con el fin de que ejerzan efecto Neuroprotector sobre las células SH-SY5Y.

En una segunda etapa (al término de las 48 horas), se añadió a los 16 pozos tratados con maca amarilla, negra y roja, nuevamente 2 concentraciones de maca iguales a las que utilizo en la primera etapa, esta vez acompañadas del péptido β -Amiloide (0.5 uM) y dejado a incubación por 48 horas más a 37°C y 5% de CO_2 .

4.18. Extracción del ARN total, cuantificación de la concentración, calidad e integridad del material genético, síntesis del ADNc y medición de la expresión genética de APP, BACE1 y PSEN1 en células de neuroblastoma humano.

Los ensayos de medición de la concentración del ARN total, la medición de la calidad e integridad del material genético, la síntesis del ADNc y la medición de la expresión genética de APP, BACE1 y PSEN1 han seguido el mismo procedimiento descrito anteriormente.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. Establecimiento del cultivo de células de neuroblastoma

Se logró establecer con éxito cultivos celulares de neuroblastoma humano SH-SY5Y en el laboratorio de Biología Molecular y Farmacología experimental de la Universidad Católica de Santa María. Estas células crecieron con éxito en medio de cultivo celular específico Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal y 1X de antibiótico-antimicótico. Las células SH-SY5Y fueron trabajadas desde su primera generación, logrando soportar repetidos pases o subcultivos por un lapso de 6 meses. Así mismo a lo largo del manejo de los cultivos celulares, no se presentaron inconvenientes que podrían ser determinantes en la obtención de los resultados, siendo estos la contaminación del cultivo celular y muerte de las células SH-SY5Y por bacterias u hongos, lo que nos lleva a afirmar que se han establecido buenas prácticas de esterilidad y buena técnica de cultivo celular. En el 2013, Brar, N. trabajo con la misma línea celular (SH -SY5Y), acondicionando las células con reactivos iguales y concentraciones a las que hemos trabajado, empleo también tripsina para lograr despegar las células que son adherente, se puede concluir indicando que los procedimientos para acondicionar líneas celulares son estándares y obedecen a protocolos ya establecidos para cada tipo de célula a investigar. Así también Brar, N., luego de acondicionar las células de neuroblastoma realizo el conteo empleando un hemocitometro y para evaluar la viabilidad celular en su trabajo, empleo la técnica de Azul de tripan, las técnicas indicadas anteriormente presentan una menor sensibilidad que otras ya que el ensayo es limitado por una mala absorción del colorante, así como la técnica es manual y puede generar errores. Muñoz, T. en el 2010 evaluó viabilidad celular con el método con sal de Tetrazolio (MTT) técnica más compleja que la de Azul de Tripan. En el presente trabajo el conteo celular y la evaluación de la viabilidad celular fueron realizadas por Fluorescencia empleando el Muse Cell Analyzer (MERCK), el cual se basa en la discriminación precisa de células muertas y vivas

En cuanto a los resultados microscópicos de las células in vitro, la morfología de las células proliferantes fue típicamente de células en forma alargada, de tamaño regular, adherentes y brillantes.

2. Extracción de ARN total a partir de células de neuroblastoma humano

El presente trabajo de investigación analizó 49 muestras de líneas celulares SH-SY5Y de neuroblastoma humano cultivadas in vitro, para la extracción de Ácido Ribonucleico (ARN), se empleó 3×10^4 células/mL, dichas células deberían estar en un 80% de viabilidad celular a más. Para la extracción de ARN total a partir de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y empleando el método TRIZOL – Alcohol Isoámilico. Brar, N, en el 2013, empleo el método de Cloroformo – Alcohol Isoámilico, usando Isopropanol libre de RNasas, empleando 2×10^6 células/mL. Muñoz, T., en el 2010 cultivo 2×10^5 células/mL para extraer ARN de células, el método empleado en esa investigación es el de columnas de silica (High Pure RNA Isolation kit (Roche)), los métodos de TRIZOL-Alcohol Isoámilico y Columnas de Silica han resultado hoy en día de gran importancia y son los métodos que son empleados con más frecuencia en ensayos de investigación y diagnóstico molecular, siendo escogidos por su simpleza, rapidez en su desarrollo y a la vez por no presentar muestras de ARN total aislado con rastros de contaminación; por otro lado el método de Cloroformo-Alcohol Isoámilico, presentan desventajas sobre los antes mencionados, ya que es un método complejo y que toma un tiempo estimado para poder trabajarlo, además de la contaminación y degradación del ARN en la mayoría de muestras por causa del Cloroformo.

La calidad del material genético se midió empleando la técnica de espectrofotometría en un espectrofotómetro multiparámetro, utilizando placas de 96 pozos. Las longitudes de onda con las cuales se trabajó: 230 nm, 260 nm y 280 nm. Para la relación 260/280, se obtuvieron valores desde 1.8 hasta 2.1; lo cual indica que existe una pureza aceptable a óptima en las muestras de células SH-SY5Y, permitiéndonos seguir con los ensayos moleculares posteriores. (66)

Por otro lado, la relación 260/230 que evalúa contaminación con Tiocianato de guanidina, nos proporcionó valores mayores a 1.5, lo que indica que no hay contaminación por sales, carbohidratos o fenoles. (Los valores de las lecturas en el espectrofotómetro y las relaciones 260/280 y 260/230 de las muestras de ARN se observa en ANEXOS 6). Comparando este

método de extracción con otros que emplean columnas de silica, podemos aseverar que el método de TRIZOL-Alcohol Isoámilico presenta mejores resultados en cuanto a la contaminación de las muestras.

También se ha evaluado la integridad de cada ARN total (49 muestras) extraído, la técnica empleada fue la electroforesis del tipo submarino, se obtuvieron bandas definidas correspondientes a los 2 tipos de ARN ribosómico (28S y 18S), estas fueron identificadas cuando las muestras fueron expuestas ante luz UV, lo que verifica la integridad de la totalidad de las muestras de ARN de células SH-Sy5Y. El ARN ribosomal (ARNr) representa la mayor parte del ARN total, aproximadamente el 75% del ARN total, el otro 25% está conformado por el ARN mensajero (ARNm) y el ARN de transferencia (ARNt), además de otros micro ARN que representan un porcentaje demasiado pequeño. En una corrida electroforética normal en el gel de agarosa, el ARN es clásico encontrar dos o tres bandas, ordenadas por tamaño, correspondientes a las subunidades 28S, 18S y 5,8S del ARNr(Figura N° 15); sin embargo, la mayoría de las veces no se logra visualizar la última banda 5,8S debido a que es muy pequeña en comparación a las otras dos, en el presente trabajo se ha evidenciado claramente las 2 bandas más grandes correspondientes al ARN ribosomal (28S y 18S) (69)

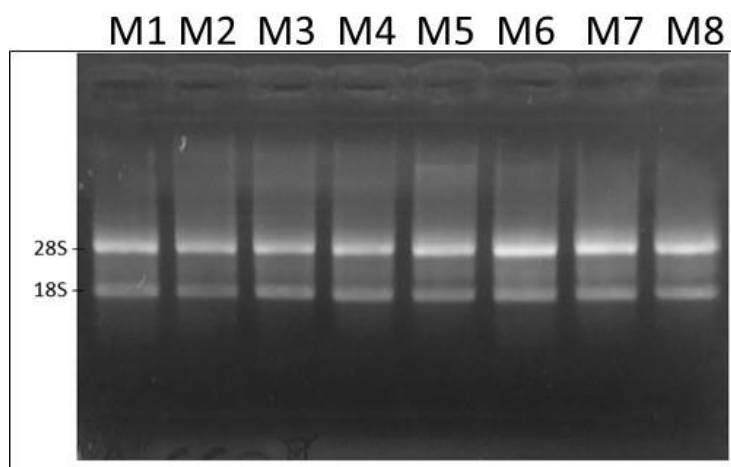


Figura 15 Corrida electroforética de los ARN extraídos de voluntarios con epilepsia. Agarosa: 1%. Condiciones de corrida: 80V/30min.

Fuente: Figura de fuente propia

3. Cuantificación del ARN obtenido por fluorimetría

La concentración del ARN obtenido se logró cuantificar empleando la técnica de fluorimetría, el equipo empleado fue el fluorómetro Qubit 2.0. El reactivo que permite la cuantificación es un Fluoróforo que se intercala en el ARN de una sola hebra, reconociendo al nucleótido Uracilo que no lo presenta el ADN bicatenario, emitiendo fluorescencia proporcional a la concentración de ARN en la muestra que se está midiendo y ésta es detectada por el equipo. El fluorómetro muestra la concentración de ARN en ng/uL. En otros trabajos de investigación como en el de Muñoz. T, en el 2010 midió la concentración de ARN por espectrofotometría empleando el equipo Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies), en el presente trabajo se ha empleado la técnica de Fluorimetría empleando el QUBIT 2.0 (LIFE TECHNOLOGIES), siendo mucho más específica y sensible que la espectrofotometría ya que emplea tecnología dirigida y específica para el ácido nucleico que se mide.

Los valores obtenidos para la cuantificación de ARN total en las 49, oscilan entre 10 ng/ μ L y 80 ng/ μ L. (En ANEXOS 7 se muestra las concentraciones de los ARN extraídos de células de Neuroblastoma humano SH-SY5Y)

4. Síntesis de ADNc y cuantificación por fluorimetría

Para iniciar el análisis de expresión genética, es necesario realizar la síntesis del ADN complementario (ADNc) de todas las muestras de ARN empleadas.

La síntesis de ADNc fue importante para iniciar la medición de la expresión de los genes APP, BACE1 y PSEN1, ya que para los ensayos es necesario tener una secuencia de ADN y no de ARN; dicha conversión se hizo con la ayuda de la enzima retro-transcriptasa.

La cuantificación del ADNc se realizó de la misma manera que la del ARN, empleando un kit específico para cuantificar ADN genómico, por fluorimetría. Los valores de concentraciones de ADNc de voluntarios con epilepsia oscilaron entre 2.25 ng/ μ L y 8.25 ng/ μ L (ANEXO 8)

5. Medición de la expresión relativa de los genes APP, BACE1 y PSEN1

La cuantificación de la expresión de los genes se realizó mediante la técnica molecular de PCR en tiempo real, esta técnica nos muestra la amplificación de la región genética de interés empleando iniciadores específicos (primes) y sondas fluorescentes. A mayor producto de interés encontrado por los cebadores, mayor emisión de fluorescencia va detectando el equipo. La fluorescencia es emitida por un agente que se intercala en los amplicones sintetizados, en este caso se utilizó el colorante fluorescente SYBRGreen. La cuantificación relativa se empleó para obtener resultados de expresión genética, este tipo de cuantificación se realiza en presencia de un gen de referencia como el Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual tiene la característica de mantener sus niveles de expresión génica constante y permite compararlo con los genes a analizar.

Este método dio dos valores para cada reacción. El primero, el ciclo umbral (threshold cycle, Ct) de cada gen, que significa el número de ciclo en el que la curva de reacción cruza el umbral, este valor indica cuántos ciclos tomó al equipo detectar una señal de amplificación de la muestra (Figura N°16). El segundo, la temperatura de fusión (melting temperature, Tm) de cada gen, que señala la temperatura a la cual la mitad del amplicón se encuentra completa y la otra mitad se encuentra desnaturalizada. Esta temperatura es única para cada gen y con ella se pudo comprobar que se amplificó el gen esperado.

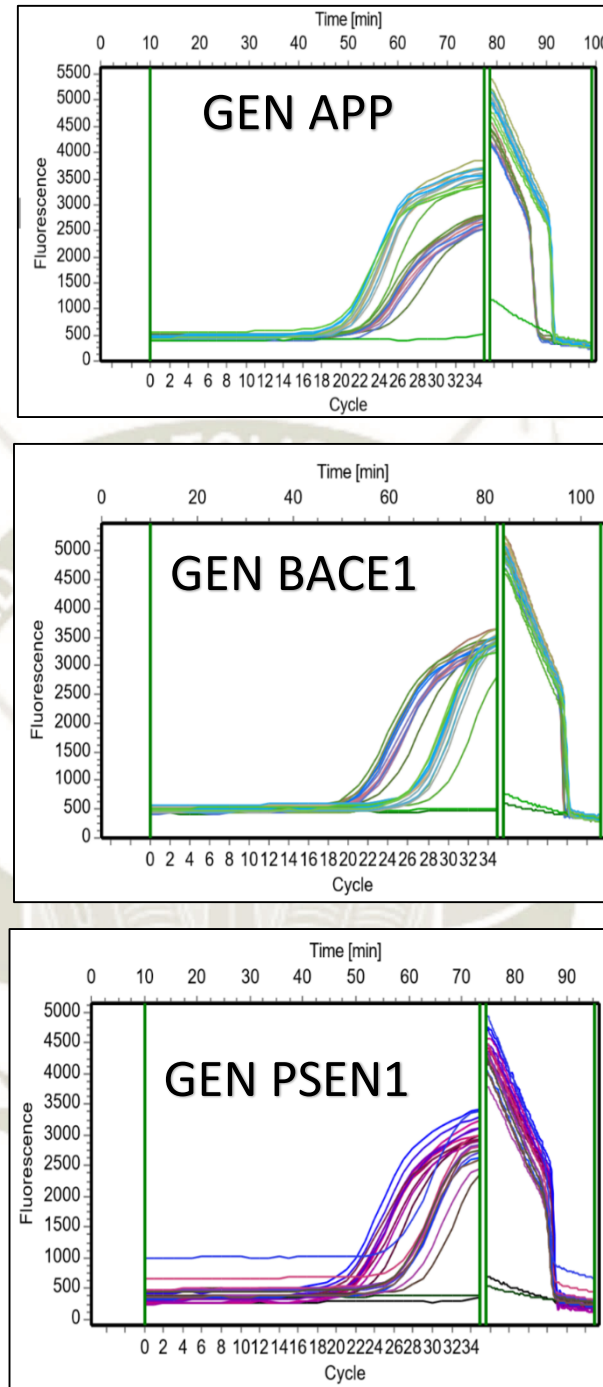


Figura 16 Curvas de amplificación por qPCR de los genes APP, PSEN1 y BACE1.

Fuente: Figura de fuente propia

En el lado izquierdo de la Figura N° 16 se puede observar la curva de amplificación, en color verde para el gen de referencia GAPDH que amplificó entre los ciclos 17 a 25 y en color azul para el gen MDR1 que amplificó entre los ciclos 24 a 29. Además, se observan dos líneas rectas por debajo de las demás curvas que corresponden a los controles negativos para ambos genes. Estos controles no muestran amplificación alguna al no haber ningún artefacto que pueda interferir con la amplificación y demuestran que los resultados son fiables y que ningún resultado puede ser algún falso positivo. En el lado derecho se observa la segunda parte de la qPCR, que corresponde al protocolo que sigue el equipo para realizar las curvas de disociación (curvas de melting).

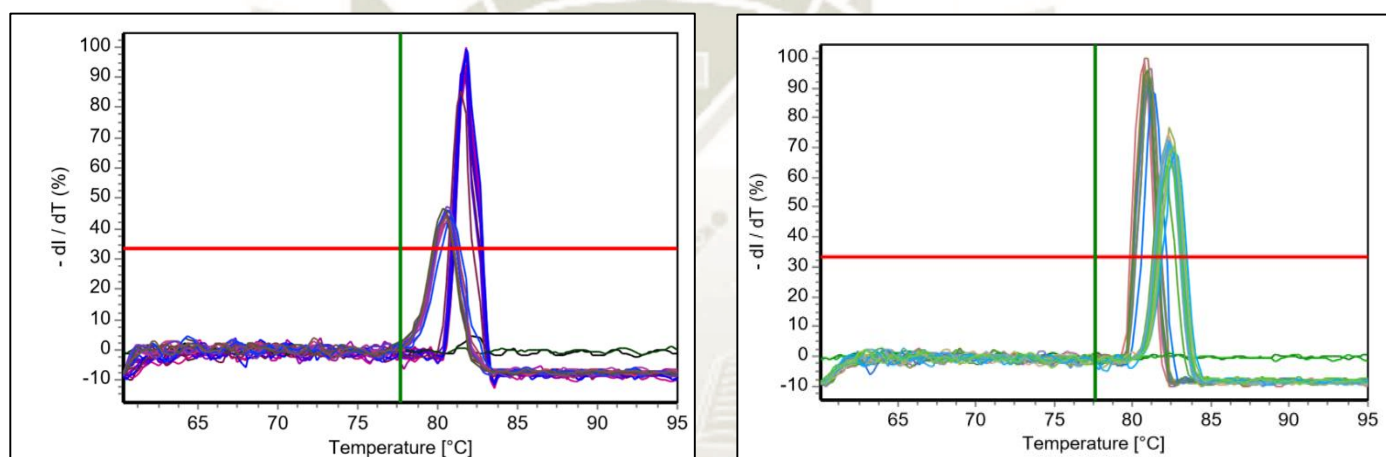


Figura 17 Curvas de disociación de los genes PSEN1, BACE1 y GAPDH

Fuente: Figura de fuente propia

En la Figura N° 17 se observan las curvas de disociación resultantes para los genes BACE1 80 ± 0.34 , PSEN1 81 ± 0.28 y GAPDH en color azul. El T_m promedio y del gen GAPDH fue 83.4 ± 0.45 para todas las muestras analizadas, como se observa en la imagen, lo que indica que se logró la amplificación de los genes esperados.

6. Reporte de la expresión de los genes APP, BACE1 y PSEN1

Los valores de expresión relativa de los genes APP, BACE1 y PSEN1 se hallaron mediante el uso de la fórmula de Pfaffl o el método llamado “delta delta Ct” que da como resultado el número de veces que se está expresando el gen analizado, en este caso hablamos de los genes APP, BACE1 y PSEN1, en comparación al gen de referencia GAPDH; se podría decir que

el gen GAPDH equivale a 1 vez y el gen APP, BACE1 y PSEN1 puede estar expresado más o menos respecto a GAPDH. En el 2010, Muñoz, T. realizó la investigación "Aproximación in vitro a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer Familiar" en la cual evaluó la expresión genética del gen APP, en ella empleo también la técnica molecular de PCR en tiempo real, analizando dicha expresión con la cuantificación del tipo relativa, además al emplear este tipo de cuantificación pues escogió el gen de referencia Glicerilaldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Por otro lado, la investigación realizada en el 2013 por Brar, N. en la que investigo el efecto de los cannabinoides en la expresión genética de APP, BACE1 y APOE, empleo también la misma técnica molecular, escogiendo como genes de referencia a GAPDH y β -2 Microglobulina (β 2M), indicando que son los mejores genes de referencia. Nur, A. en el 2015, escogió la PCR en tiempo real multiplex para analizar en una misma reacción más de un gen cuando evalúa la expresión de APP, BACE1, ADAM10, EEF1A1; escogiendo como genes de referencia GAPDH y β -Actina.

Un primer análisis fue la expresión genética de células SH-SY5Y sometidas a 5 concentraciones distintas del péptido β -Amiloide (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 μ M); un segundo análisis el cual evalúa la expresión génica de las células antes mencionadas cuando son sometidas a 3 ecotipos de maca (amarilla, roja y negra) en 5 concentraciones distintas (0.5, 1, 10, 25 y 50 μ g/mL); un tercer análisis evaluando el efecto Neuroprotector que podría tener los 3 ecotipo de maca en las células SH-SY5Y, expuestas a β -Amiloide; y un cuarto y último análisis del efecto Neuroprotector que podría tener una macamida sintética en células expuestas a β -amiloide.

Cuando células SH-SY5Y fueron expuestas a 5 concentraciones de β -Amiloide, y se midió su expresión, se observó que a concentraciones máximas de 10 μ M, fue mayor en la expresión de los genes APP, BACE1 y APSEN1, así también las concentraciones restantes produjeron un incremento en la expresión génica.

En cuanto a los tratamientos con los 3 ecotipos de maca, nuestro estudio demostró que los niveles sobre expresados mediados por β -Amiloide son regulados y disminuyen significativamente cuando son tratados con este tubérculo (maca). Mejor respuesta inhibiendo la actividad de β -Amiloide se da con el tratamiento con maca negra y resultados muy parecidos los presenta cuando se aplica N – benciloctadecadienamida (M75) sobre las

células SH-SY5Y cuando son estresadas con β -Amiloide. Esto nos indica que la maca negra. En el estudio de Brar, N del 2013, se probó el efecto que podría tener Anandamida en la expresión de los genes APP, APOE y BACE1, encontrándose que la Anandamida este estudio también demostró que la Anandamida disminuyó significativamente los niveles de expresión de APP y BACE1, pero no ApoE. Los resultados de expresión de todas las muestras se encuentran en EL ANEXO 9.

7. Resultados y Análisis de la Variación de la Expresión Génica de células SH-SY5Y con respecto a 3 ecotipos de maca.

Se puede indicar que con referencia a los 3 ecotipos de maca cuando fueron expuestos a células SH-SY por 24 horas y luego se añadió una concentración de 0.5uM del péptido β -Amiloide, los 3 ecotipos de maca reducen la sobre expresión genética presente en las células de neuroblastoma, provocadas por el péptido β -Amiloide. El ecotipo maca negra en la concentración de 0.5ug/ml, tendría un mejor efecto disminuyendo la sobre expresión en el gen BACE1 en 12.5 veces menos; así también al haber empleado una concentración de 10ug/mL de maca negra se observó una disminución en la sobre expresión de hasta 24,6 veces. Con respecto al ecotipo maca roja y amarilla, reducen también los niveles sobre expresados de BACE1, los rangos oscilan entre 5.9-10.3 veces menor expresión a concentraciones de maca de 0.5ug/mL y 3.38 – 3.35 veces menor expresión a 10ug/mL de maca roja y amarilla.

Con respecto a la expresión provocada por los Co-Tratamientos con los 3 ecotipos de maca, podemos aseverar que al tratar las células con maca negra(0.5ug/mL) por 24 horas y luego añadir nuevamente maca en la misma concentración incluyendo además el péptido β -Amiloide, la expresión genética se ve reducida hasta por 53.9 veces, le sigue el ecotipo maca amarilla con hasta 4.15 veces menos y maca ecotipo rojo, 2.29 veces. Así también la evaluación de la expresión génica con que el mismo tratamiento y co tratamiento con maca negra(10ug/ml) que se ha descrito anteriormente, reduce la expresión de BACE1 hasta en 42 veces, le sigue el ecotipo maca amarilla con 3.21 veces menos expresado y 2.68 veces para el ecotipo maca roja.

Al ser expuestas las células SH-SY5Y al péptido β -Amiloide (agente estresante), se midió la expresión del gen PSEN1 el cual nos indica que hay una sobreexpresión de hasta 13.85

veces más que el gene de referencia GPDH. Cuando se añadió el ecotipo maca negra(0.5ug/mL) sobre las células SH-SY5Y y se dejó en incubación por 24 horas y luego se expuso dichas células a 5uM del péptido, se observó que hubo una reducción en la expresión génica de PSEN1 de hasta 125 veces; al emplear una concentración de 10ug/mL del ecotipo maca negra también redujo los niveles de expresión del gen PSEN1 hasta en 22.3 veces. En cuanto al ecotipo maca roja y maca amarilla, estos también redujeron los niveles de expresión del gen analizado, pero con valores muy parecidos, usando 0.5ug/mL (3.3-4.9 veces) y trabajando con 10ug/mL de maca negra (3.1-4.17 veces). Al analizar la expresión génica de PSEN1 en las células de neuroblastoma, la expresión del gen PSEN1 cuando se empleó CO-Tratamientos se logró encontrar que las muestras con maca negra expuestas a 48 horas han logrado reducir la sobreexpresión genética en 29.4 y 10.5 veces respectivamente. Los niveles de expresión de PSEN1 frente a la exposición con el ecotipo rojo fueron muy bajos, la expresión solo cambio en 3.25 y 1.56 veces para los tratamientos con 0.5ug/mL y 10ug/mL respectivamente.

Se midió la expresión génica de APP en células expuestas al péptido β -Amiloide, presentando una sobreexpresión de 7.45 veces. Dichas células al ser tratadas con el ecotipo maca negra, a una concentración de 0.5ug/mL y 10ug/mL, redujeron su nivel de expresión en hasta 4.7 y 14.05 veces menos respectivamente. Los Co-tratamientos con las mismas concentraciones de maca, también redujeron los niveles de sobreexpresión entre 7.6 y 8.3 veces menos.

EL ecotipo maca roja para los tratamientos de 24 horas con concentraciones de 0.5 y 10ug/ml redujeron los niveles de expresión solamente en 0.22 y 4.5 veces respectivamente, siendo el ecotipo con menos capacidad para reducir la expresión genética. Maca roja cuando fue administrada como Co-Tratamiento redujo la expresión solamente en 21.3 veces a una concentración de 0.5ug/ml y 17 veces cuando a una concentración de 10ug/ml, cuando se expuso células de neuroblastoma con maca roja cuando se trabajó a 48 horas de incubación con maca.

Los tratamientos que tuvieron de por medio la administración del ecotipo maca amarilla (0.5ug/mL y 10ug/mL), redujeron la sobreexpresión provocada por β -Amiloide en 6.15 y 4.9 veces respectivamente. En cuanto a los Co-Tratamientos, la expresión genética se vio

disminuida en 12.6 y 3.22 veces cuando las células fueron tratadas por 48 horas (Co-Tratamiento),

Al trabajar sobre el gen BACE1, los resultados de expresión genética cuando fueron expuestas las células SH-SY5Y al péptido β -Amiloide, se evidencio una sobreexpresión de dicho gen por 42.22 veces. Cuando se añadió dos concentraciones del ecotipo maca (0.5 y 10ug/mL) expuestas por 24 horas, la sobreexpresión disminuyo en 54.8 y 111.1 veces. Cuando se agregaron los co-tratamientos de maca negra por 48 horas, se obtuvo una disminución de la expresión en 234.5 veces menos (0.5ug/ml) y 183.5 veces menos para una concentración de 10ug/ml.

Cuando se probó los ecotipos maca roja y maca amarilla (24 horas), a una concentración de 0.5ug/ml, se obtuvo una disminución en la expresión de 44.9 y 25,7 veces menos; y al probar la concentración de maca 10ug/mL, se encontró que el gen BACE1 disminuye la sobreexpresión en 14.7 y 15.02 veces.

Al probar los Co-tratamientos de maca roja y amarilla, después de las 48 horas, se encontró una expresión disminuida de 9.95 y 18.04 veces menos a una concentración de maca roja de 0.5ug/mL. AL probar los Co-Tratamientos con una concentración de maca 10ug/mL, se logró identificar una diminución en la expresión del gen BACE1 de 11.66 y 13.98 veces menos.

8. Resultados y Análisis de la Variación de la Expresión Génica de células SH-SY5Y administrando N – benciloctadecadienamida (M75).

Se probó también el efecto que podría tener N – benciloctadecadienamida (M75) en la reducción de la sobreexpresión génica de las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano cuando fueron sometidas al péptido β -Amiloide (0.5uM).

Con respecto al análisis de la expresión del gen BACE1, M75 al ser administrada en 2 concentraciones distintas (0.5ug/mL y 10ug/mL) redujeron satisfactoriamente la sobreexpresión estimulada por β -Amiloide. Las células SH-SY5Y presentaron 42.22 veces aumentada la expresión cuando se administró 5uM de β -Amiloide, M75 logro disminuir la expresión en 4222 veces y 108.25 veces menos, teniendo mejores resultados que cuando se administró solamente maca en su totalidad (extracto). También se administró M75 como Co-

Tratamiento a las células estresadas con β -Amiloide, en concentraciones de 0.5 y 10ug/mL de M75, incubando por 48 horas para luego administrar las mismas concentraciones de M75 por 48 horas más en conjunto con β -Amiloide. Este Co-Tratamiento permitió reducir la expresión genética de BACE1 en 162.4 y 150.8 veces menos.

Al evaluar la expresión del gen PSEN1 con los Co-Tratamientos, se observa que las células SH-SY5Y expuestas a 5uM de β -Amiloide y dejándolas con M75 por 24 horas, la expresión genética de la muestra con 0.5ug/mL de M75, redujo la expresión génica 28.26 veces en células con 10ug/mL de M75, redujo 4.87 veces. Para los Co-Tratamientos administrados a las 48 horas y donde se agregó por 2 veces consecutivas M75, la expresión genética se redujo en 18.5 (0.5ug/mL M75) y 11.16 (10ug/mL).

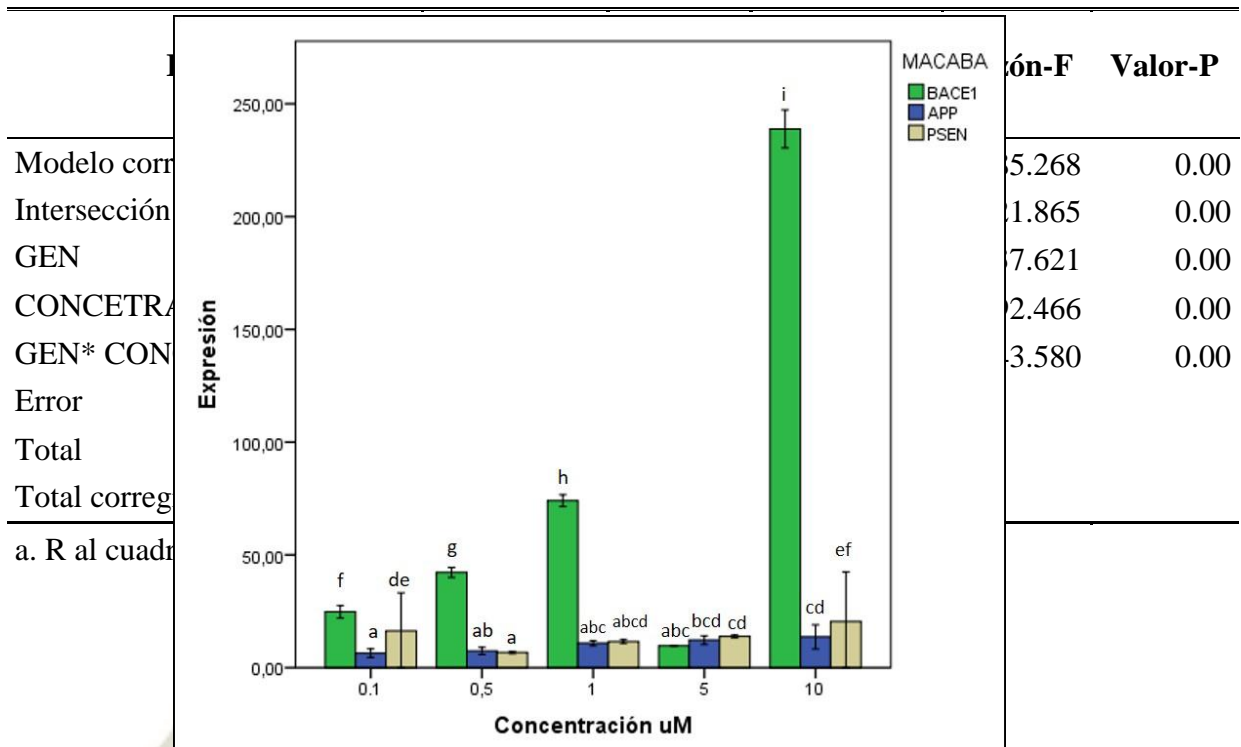
La expresión del gen APP con los Co-Tratamientos, nos brinda resultados también bastante satisfactorios, se observa que las células SH-SY5Y expuestas a 5uM de β -Amiloide y dejándolas con M75 por 24 horas, la expresión genética de la muestra con 0.5ug/mL de M75, redujo la expresión génica 745 veces y en células con 10ug/mL de M75, redujo 19.1 veces. Para los Co-Tratamientos administrados a las 48 horas y donde se agregó por 2 veces consecutivas M75, la expresión genética se redujo en 28.65 (0.5ug/mL M75) y 26.6 (10ug/mL).

9. Resultados Estadísticos

En la Tabla N°11 se muestra el análisis de varianza multifactorial realizado para contrastar la hipótesis nula referida a la expresión de los genes APP, BACE1 y PSEN1, y de las concentraciones de β -Amiloide. Se puede observar que en dicha tabla existe un efecto estadísticamente significativo en la expresión genética de las células para el factor gen, es decir la expresión genética no será la misma si se evalúan un gen u otro (APP, BACE1, PSEN1) a una misma concentración del péptido y la interacción de ambos factores presentaron un efecto significativo ($p < 0.05$), es decir la expresión genética no será la misma si se evalúan un gen u otro a diferentes concentraciones del péptido β -Amiloide.

Tabla 11 Análisis de varianza multifactorial para la expresión genética de BACE1, APP y PSEN1 en células SH-SY5Y expuestas a β -Amiloide

Figura 18 Expresión genética de BACE1, APP y PSEN1 en células SH-SY5Y expuestas a β -Amiloide



Modelo corr	5.268	0.00
Intersección	1.865	0.00
GEN	7.621	0.00
CONCETRA	2.466	0.00
GEN* CON	3.580	0.00
Error		
Total		
Total correg		
a. R al cuadr		

Con-F	Valor-P
5.268	0.00
1.865	0.00
7.621	0.00
2.466	0.00
3.580	0.00

En la Figura N° 18, se muestra los valores promedios para la expresión génica de las células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, expuestas a β -Amiloide, en verde el gen BACE1, en azul el gen APP y en beige el gen PSEN1. Se puede observar que el gen BACE1 presentó una mayor sobreexpresión génica estadísticamente significativa (95% de confianza) y mayor que los genes APP y PSEN1 con valores crecientes a mayor concentración de β -Amiloide. Así mismo, dicha sobreexpresión llegó a valores de 238.86 \pm 8.41 cuando las células fueron sometidas a una concentración de 10 μ M de β -Amiloide. La menor expresión encontrada fue el gen APP a concentraciones de 0.1 μ M, estos datos se pueden observar en la Tabla N° 12.

Tabla 12 Comparaciones múltiples para la expresión genética en células SH-SY5Y expuestas a β -amiloide.

	B amiloide	Tasa de crecimiento	Desviación estandar
BACE1	0.1μM	24.76 \pm 2.78 ^c	1.1201
	0.5μM	42.22 \pm 2.17 ^b	0.8750
	1μM	74.03 \pm 2.63 ^d	1.0632
	5μM	9.71 \pm 0.11 ^a	0.0450
	10μM	238.86 \pm 8.41 ^e	3.3851
APP	0.1μM	6.45 \pm 1.94 ^a	0.7812
	0.5μM	7.45 \pm 1.61 ^a	0.6509
	1μM	10.87 \pm 1.17 ^b	0.4701
	5μM	12.22 \pm 1.89 ^{bc}	0.7604
	10μM	13.98 \pm 4.23 ^c	1.7046
PSEN1	0.1μM	16.35 \pm 16.81 ^a	6.7675
	0.5μM	6.75 \pm 0.51 ^a	0.2055
	1μM	11.58 \pm 0.8 ^a	0.3233
	5μM	13.85 \pm 0.64 ^a	0.2573
	10μM	20.44 \pm 22.07 ^a	8.8855

El análisis de varianza realizado para la expresión genética en el gen BACE mostró un valor- $p < 0.05$, al igual que el realizado para los promedios de la expresión del gen APP cuando se sometió a diferentes concentraciones de B-amiloide, esto significa que existen diferencias estadísticamente significativas con un 95 % de confianza para los promedios de la expresión observados en genes BACE y APP sometidos a diferentes concentraciones de β -Amiloide (μM). Para poder identificar diferencias entre los tratamientos se empleó la prueba de comparaciones múltiples según LSD de Fisher identificando diferencias estadísticamente significativas en aquellos grupos con diferente superíndice. El Análisis de varianza realizado para PSEN1 muestra que no existen diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.0638$) entre los promedios de las expresiones genéticas cuando las células son sometidas a diferentes concentraciones de β -Amiloide.

También en el caso del análisis en el cual se cultivaron células SH-SY5Y y fueron expuestas a cinco concentraciones (0.5, 1, 10, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$) diferentes de 03 ecotipos de maca (amarilla, negra y roja). Se muestra en la Tabla N° 13 en el análisis de varianza multifactorial para la expresión del gen BACE1, realizado para contrastar la hipótesis nula referidas a la expresión de los genes BACE1. Así también se encontraron diferencias significativas en cuanto a las 5 concentraciones distintas de maca con las que se trabajó, teniendo también valores $p = 0.00$. Se puede mostrar también en la Figura N° 19 el cuadro comparativo de la expresión génica versus las cinco concentraciones de los 03 ecotipos de maca, que para la concentración de 0.5 y 1 $\mu\text{g/mL}$ no se han encontrado diferencias significativas a un nivel de confianza de 95%, al realizar el análisis de comparaciones múltiples ambas presentan los mismos superíndices (LSD Fisher) (Tabla N° 14)

Tabla 13 Análisis de varianza multifactorial para la expresión del gen BACE1 en células SH-SY5Y expuestas a 03 ecotipos maca

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo corregido	64,905 ^a	14	4,636	54,930	0.000
Intersección	42,214	1	42,214	500,173	0.000
Tipo maca	9,735	2	4,868	57,674	0.000
Concentración	18,553	4	4,638	54,956	0.000
Tipo maca * Concentración	36,617	8	4,577	54,231	0.000
Error	2,532	30	,084		
Total	109,651	45			
Total corregido	67,437	44			

a. R al cuadrado = ,962 (R al cuadrado ajustada = ,945)

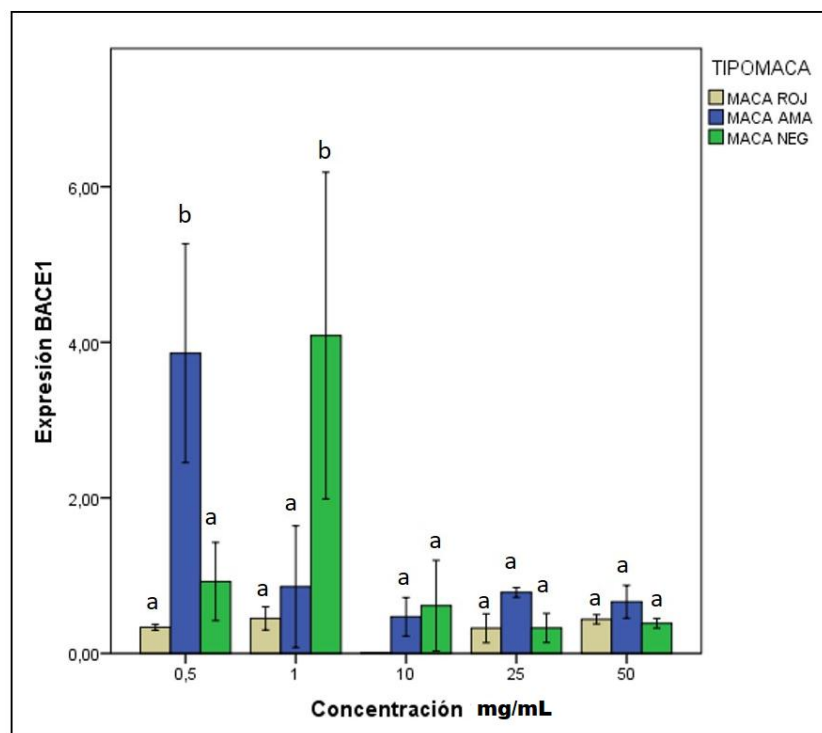


Figura 19 Expresión del gen BACE1 en células SH-SY5Y expuestas a 03 ecotipos tipos de maca

Tabla 14 Comparaciones múltiples para la expresión del gen BACE1 en células SH-SY5Y expuestas a maca

		Expresión	Desviación Estándar
Maca Roja	0.5 ug/mL	0.34+/-0.04 ^b	0.0156
	1 ug/mL	0.45+/-0.15 ^c	0.0600
	10 ug/mL	0.01+/-0.00 ^a	0.0000
	25 ug/mL	0.32+/-0.19 ^b	0.0751
	50 ug/mL	0.44+/-0.06 ^c	0.0236
Maca Amarilla	0.5 ug/mL	3.86+/-1.41 ^b	0.5666
	1 ug/mL	0.86+/-0.78 ^a	0.3150
	10 ug/mL	0.47+/-0.25 ^a	0.1000
	25 ug/mL	0.78+/-0.06 ^a	0.0252
	50ug/mL	0.66+/-0.21 ^a	0.0851
Maca Negra	0.5 ug/mL	0.92+/-0.50 ^a	0.2026
	1 ug/mL	4.09+/-2.10 ^b	0.8457
	10 ug/mL	0.61+/-0.58 ^a	0.2350
	25 ug/mL	0.33+/-0.19 ^a	0.07506

En cuanto a la expresión génica de APP en las células SH-SY5Y expuestas 05 concentraciones distintas de 03 ecotipos de maca, en el análisis de varianza multifactorial en la expresión del gen APP en células SH-SY5Y, en la Tabla N°15 el análisis que se realizó para contrastar la hipótesis nula referidas a la expresión del gen APP se encontró diferencias estadísticamente significativas en cuanto a las 5 concentraciones distintas de 03 ecotipos de maca con las que se trabajó (amarilla, negra y roja), teniendo también ($p < 0.05$). Resultados iguales fueron al encontrar también diferencias significativas cuando se trabaja con diferentes concentraciones de maca.

Tabla 15 Análisis de varianza multifactorial para la expresión del gen APP en células SH-SY5Y expuestas a 03 ecotipos de maca

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo corregido	38404.884 ^a	14	2743.206	178.669	0.000
Intersección	2343.596	1	23436.596	1526.460	0.000
TIPOMACA	35890.284	2	17945.142	1168.794	0.000
CONCENTRACION	664.154	4	166.039	10.814	0.000
TIPOMACA * CONCENTRACION	1850.446	8	231.306	15.065	0.000
Error	460.607	30	15.354		
Total	62302.087	45			
Total corregido	38865.491	44			

a. R al cuadrado = ,962 (R al cuadrado ajustada = ,945)

En la Figura N° 20 figura se muestra los valores promedios para la expresión génica del APP en células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, expuestas a 03 ecotipos de maca a cinco concentraciones diferentes. En verde el ecotipo maca negra, en azul el ecotipo maca amarilla y en beige el ecotipo maca roja. Se puede observar que las células expuestas al ecotipo maca roja presentan mayor expresión génica estadísticamente significativa (95% de confianza) y mayor que los ecotipos Amarilla y Negra Así mismo, dicha sobreexpresión llegó a valores de 86.22+/-26.79 (Tabla N° 16) cuando las células fueron sometidas a una concentración de 50ug/mL de maca roja. La menor expresión encontrada fue empleando maca negra a concentraciones de 25ug/mL.

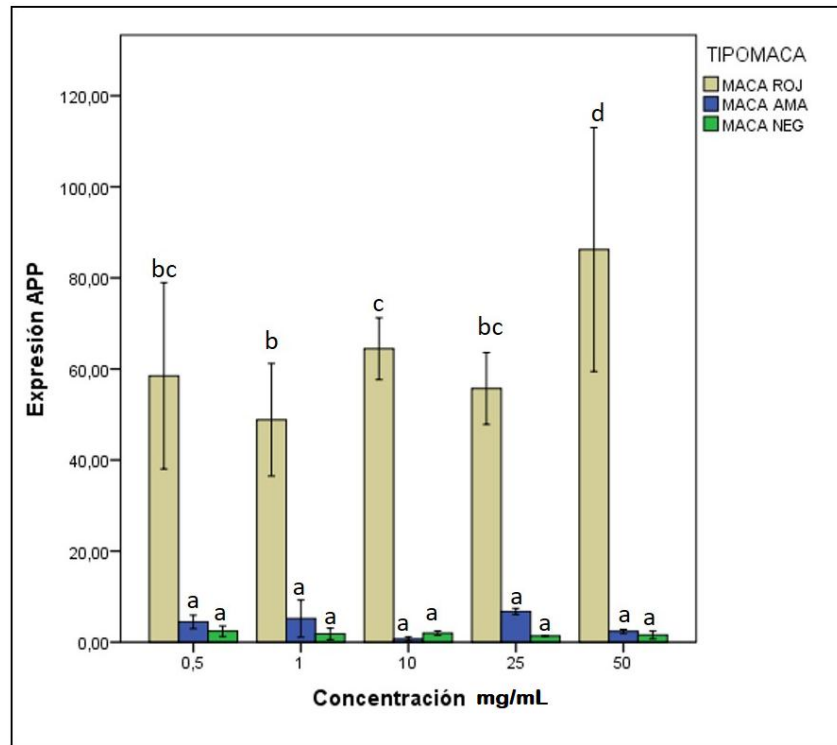


Figura 20 Expresión del gen APP en células SH-SY5Y expuestas a 03 ecotipos de maca

Tabla 16 Comparaciones múltiples para la expresión del gen APP en células SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones y 03 ecotipos de maca

		Expresión	Desviación Estándar
Maca Roja	0.5 ug/mL	58.49+/-20.46 ^{ab}	8.2351
	1 ug/mL	48.84+/-12.37 ^a	4.9800
	10 ug/mL	64.45+/-6.79 ^b	2.7350
	25 ug/mL	55.72+/-7.89 ^{ab}	3.1750
	50 ug/mL	86.22+/-26.79 ^c	10.785
Maca Amarilla	0.5 ug/mL	4.44+/-1.49 ^c	0.6000
	1 ug/mL	5.17+/-4.07 ^c	1.6400
	10 ug/mL	1.71+/-0.41 ^a	0.1650
	25 ug/mL	6.75+/-0.69 ^d	0.2761
	50 ug/mL	2.38+/-0.43 ^b	0.1750
Maca Negra	0.5 ug/mL	2.41+/-1.16 ^c	0.4650
	1 ug/mL	1.82+/-1.25 ^{ab}	0.5050
	10 ug/mL	1.97+/-0.48 ^{ab}	0.1950
	25 ug/mL	1.38+/-0.11 ^a	0.0451
	50 ug/mL	1.58+/-0.84 ^a	0.3400

En cuanto a la expresión génica de PSEN1 con 03 ecotipos de maca, sobre células SH-SY5Y de neuroblastoma humano, en la Tabla N°17 se ha encontrado diferencia estadísticamente significativa $p < 0.5$ en relación al trabajar con 3 tipos diferentes de maca (amarilla, negra y roja), también se puede aseverar que hay diferencias significativas en cuanto se trabaja con diferentes concentraciones de 3 ecotipos de maca. En cuanto a la FIGURA N°21, se observan los promedios en la expresión génica de PSEN1 cuando fueron expuestas a 5 concentraciones de maca, en azul se muestra la expresión del gen PSEN1 expuesto a maca amarilla, en verde se muestran los resultados para células expuestas a maca negra y en beige se encuentran las muestras expuestas a maca roja. En el análisis de comparaciones múltiples (Tabla N° 18), se podemos aseverar que

la mayor expresión génica de PSEN1 se da en las células expuestas a maca roja (17.6 +/-0.85) y resultados mínimos en los cambios de expresión génica se dio cuando se trabajó con el ecotipo maca negra (0.01+/0.02-). Para encontrar diferencias entre los tratamientos se empleó la prueba de comparaciones múltiples según LSD de Fisher identificando diferencias estadísticamente significativas entre grupos con diferente superíndice

Tabla 17 Análisis de varianza multifactorial para la expresión del PSEN1 en células SH-SY5Y expuestas a 03 ecotipos de maca

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo corregido	986.409 ^a	14	70.458	102,658	0.00
Intersección	37.638	1	377.638	550,226	0.00
TIPOMACA	436.396	2	218.198	317,918	0.00
CONCENTRACION	271.478	4	67.869	98,887	0.00
TIPOMACA * CONCENTRACION	278.536	8	34.817	50,729	0.00
Error	20590	30	,686		
Total	1384.638	45			
Total corregido	1006.999	44			

a. R al cuadrado = ,962 (R al cuadrado ajustada = ,945)

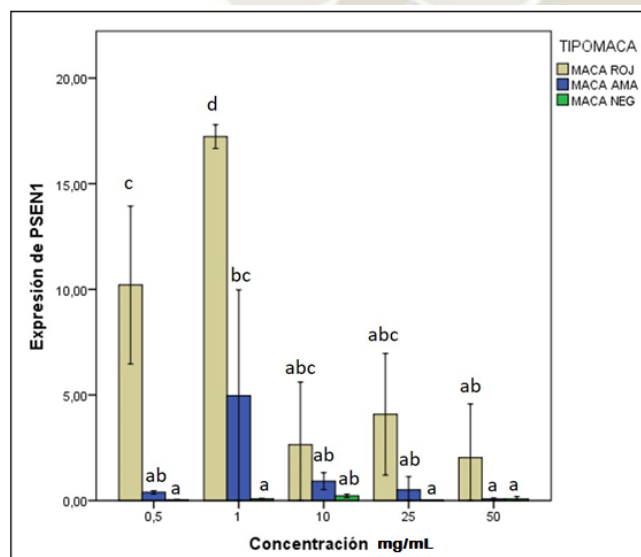


Figura 21 Expresión del gen PSEN1 en células SH-SY5Y expuestas a 03 ecotipos maca

Tabla 18 Comparaciones múltiples para la expresión del gen PSEN1 en células SH-SY5Y expuestas a diferentes concentraciones y tipos de maca

		Expresión	Desviación Estándar
Maca Roja	0.5 ug/mL	7.2+/-12.85 ^c	5.1742
	1 ug/mL	17.16+/-0.85 ^d	0.3420
	10 ug/mL	2.64+/-2.96 ^{ab}	1.1935
	25 ug/mL	2.75+/-5.22 ^{ab}	2.1000
	50 ug/mL	2.03+/-2.54 ^a	1.0227
Maca Amarilla	0.5 ug/mL	0.39+/-0.07 ^a	0.0300
	1 ug/mL	4.96+/-5.01 ^b	2.0179
	10 ug/mL	0.92+/-0.4 ^a	0.1600
	25 ug/mL	0.5+/-0.63 ^a	0.2550
	50 ug/mL	0.07+/-0.05 ^a	0.0200
Maca Negra	0.5 ug/mL	0.04+/-0.01 ^{ab}	0.00578
	1 ug/mL	0.08+/-0.02 ^c	0.0100
	10 ug/mL	0.22+/-0.07 ^d	0.0300
	25 ug/mL	0.01+/-0.02 ^a	0.0100
	50 ug/mL	0.07+/-0.11 ^c	0.0451

En una tercera y cuarta etapa del ensayo, se trabajo con celulas de neuroblastoma, exponiendolas a diferentes tratamiesntos con los 03 ecotipos de maca(0.5 y 10ug/mL) por 24 horas tratando de que maca desarrolle un efecto neuroprotector en las celulas cuando estas sean expuestas a β -Amiloide(5uM) por 24 horas mas, asi tambien otro tratamiento de celulas con 3 ecotipos de maca (0.5 y 10ug/mL) por 48 horas para luego adminitrar un Co-Tratamiento nuevamnete con maca amarilla, negra y roja con β -Amiloide. Un ultimo tratamiento que se analizo fue cuando las celulas SH-SY5Y fueron expuestas a una macamida sintetica la cual se administro en concentraciones de 0.5 y 10ug/mL, asi como se preparo la macamida sintetica como Co-Tratamiento.

En la Tabla N° 19, se muestra el análisis de varianza multifactorial de la expresión genética de BACE1 expuesta a 7 tratamientos con 3 ecotipos distintos de maca y N-benciloctadecanamide (M75). Se observa en cuanto al analizar los 3 ecotipos de maca y M75 (sustancias) sobre células de neuroblastoma, existe diferencias estadísticamente significativa ($p < 0.5$), así también cuando se analizaron estadísticamente 7 tratamientos sobre células SH-SY5Y, se evidencia que existe diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tipos distintos de tratamiento. Cuando las células de neuroblastoma son tratadas con diferentes tipos de maca y M75, y a su vez empleando distintos tipos de tratamiento, se observa la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.5$),

Tabla 19 Análisis de varianza multifactorial para la expresión del gen BACE1 en células SH-SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo corregido	452.454 ^a	27	16.758	34.162	0.00
Intersección	300.359	1	300.359	612.308	0.00
SUSTANCIA	74.335	3	24.778	50.513	0.00
TRATAMIENTO	73.339	6	12.223	24.918	0.00
SUSTANCIA * TRATAMIENTO	304.780	18	16.932	34.518	0.00
Error	27.470	56	0.491		
Total	780.282	84			
Total corregido	479.924	83			

a. R al cuadrado = ,962 (R al cuadrado ajustada = ,945)

En la Figura N° 22, se muestra las comparaciones en un panorama general entre todas, podemos observar que el valor más bajo de la expresión en el gen BACE1, está en el T2 (Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h) con M75, en T1 (Blanco + DMSO) la expresión es similar con maca roja y con M75, en T3 (Cel + Sust (10ug/ml) + B-A 24h), es similar la expresión con maca negra y M75, en T4 (DMSO + B-A 24h) salió elevado con M75, en T5 (Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h) y T6 (Cel + Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h) expresión igual con maca negra y M75, en T7 (Cel + DMSO + B-A 48h) mejor con maca negra que con M75.

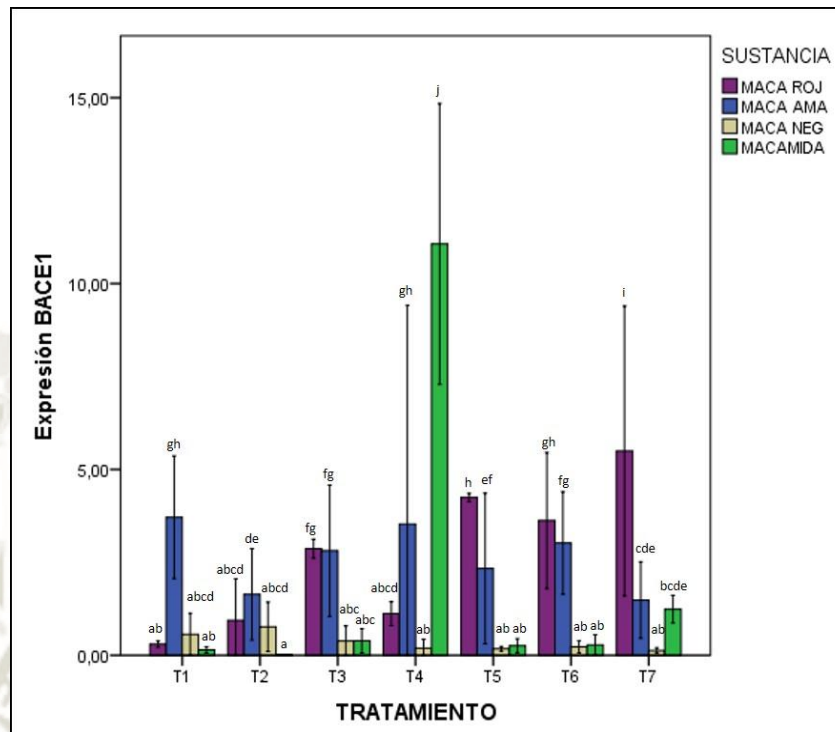


Figura 22 Expresión del gen BACE1 en células SH-SY5Y, expuestas a distintos tipos de tratamiento

En cuanto a la Tabla N° 20 en la que se reporta las comparaciones múltiples para la expresión del gen BACE1 en células SH-SY5Y expuestas a diferentes tratamientos con 3 ecotipos de maca y M75, se aprecia que, para los tratamientos de maca roja, la expresión genética de BACE1 disminuye cuando se administra ambos tratamientos, o sea no existe diferencias entre los tratamientos, de igual forma sucede con los ecotipos amarilla y negra. Con respecto a la administración de M75 se puede inferir que las células de neuroblastoma que son expuestas al péptido β -Amiloide podrían tener una respuesta igual o parecida en la disminución de la expresión génica, comparándolo con la administración de maca entera (extracto).

Tabla 20 Comparaciones múltiples para la expresión del gen BACE1 en células SH-SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento y sustancia

		Expresión	Desviación Estándar
Maca Roja	Blanco + DMSO	0.3+/-0.09 ^a	0.0351
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.94+/-1.12 ^a	0.4500
	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	2.87+/-0.25 ^b	0.1026
	DMSO + B-A 24h	1.12+/-0.32 ^a	0.1300
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	4.24+/-0.11 ^c	0.0451
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	3.62+/-1.83 ^{bc}	0.7376
	Cel + DMSO + B-A 48h	5.50+/-3.9 ^d	1.5709
Maca Amarilla	Blanco + DMSO	3.71+/-1.65 ^c	0.6637
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	1.64+/-1.23 ^a	0.4943
	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	2.81+/-1.77 ^{ab}	0.7112
	DMSO + B-A 24h	3.53+/-5.89 ^c	2.3700
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	2.34+/-2.03 ^{ab}	0.8157
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	3.02+/-1.38 ^{ab}	0.5557
	Cel + DMSO + B-A 48h	1.48+/-1.03 ^a	0.4143
Maca Negra	Blanco + DMSO	0.56+/-0.57 ^{bc}	0.2300
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.77+/-0.66 ^c	0.2665
	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	0.38+/-0.41 ^{ab}	0.1650
	DMSO + B-A 24h	0.19+/-0.24 ^a	0.0950
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.18+/-0.06 ^a	0.0252

	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	0.23+/-0.17 ^a	0.0666
	Cel + DMSO + B-A 48h	0.13+/-0.08 ^a	0.0306
	Blanco + DMSO	0.15+/-0.08 ^a	0.0321
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.01+/-0.00 ^a	0.0000
	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	0.39+/-0.32 ^{ab}	0.1300
	DMSO + B-A 24h	11.07+/-3.78 ^c	1.5205
M75	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.26+/-0.19 ^{ab}	0.0751
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	0.28+/-0.27 ^{ab}	0.1100
	Cel + DMSO + B-A 48h	1.24+/-0.38 ^b	0.1510

Comparaciones hechas Entre los tratamientos para cada tipo de sustancia.

En el análisis de varianza multifactorial para la expresión del gen BACE1 en células SH—SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamientos (TABLA N°21) se aprecia que hay diferencias estadísticamente significativas cuando se analizó diferentes Sustancias (3 ecotipos de maca y M75) en la expresión del gen BACE1, también se encontraron valore $p < 0.5$ en cuanto se analizaron los diferentes tratamientos, indicándonos la diferencia significativa entre estos. Y al analizar tratamientos y sustancias en conjunto pues estas también son independientes y son diferentes entre sí.

Tabla 21 Análisis de varianza multifactorial para la expresión del gen BACE1 en células SH—SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo corregido	452.454 ^a	27	16.758	34.162	0.00
Intersección	300.359	1	300.359	612.308	0.00
SUSTANCIA	74.335	3	24.778	50.513	0.00
TRATAMIENTO	73.339	6	12.223	24.918	0.00
SUSTANCIA * TRATAMIENTO	304.780	18	16.932	34.518	0.00
Error	27.470	56	0.491		
Total	780.282	84			
Total corregido	479.924	83			

a. R al cuadrado = ,962 (R al cuadrado ajustada = ,945)

En la Figura N° 23, se muestran comparaciones entre las Sustancias (3 ecotipos de maca y M75) y los diferentes tratamientos comparándolos con la expresión en el gen APP. En el T1 el valor más bajo en cuanto a la expresión genética de APP corresponde a la Sustancia M75, en cuanto al tratamiento T2 la expresión más baja que se da para el gen APP fue M75, seguido del ecotipo maca roja, el T3 tuvo su menor expresión génica con M75, seguido del ecotipo maca negra. En el T5 la reducción de la expresión génica con M75 y con el ecotipo maca roja fueron iguales y para el T6 fue mejor la reducción de los niveles de expresión de APP con el ecotipo maca roja seguido de M75.

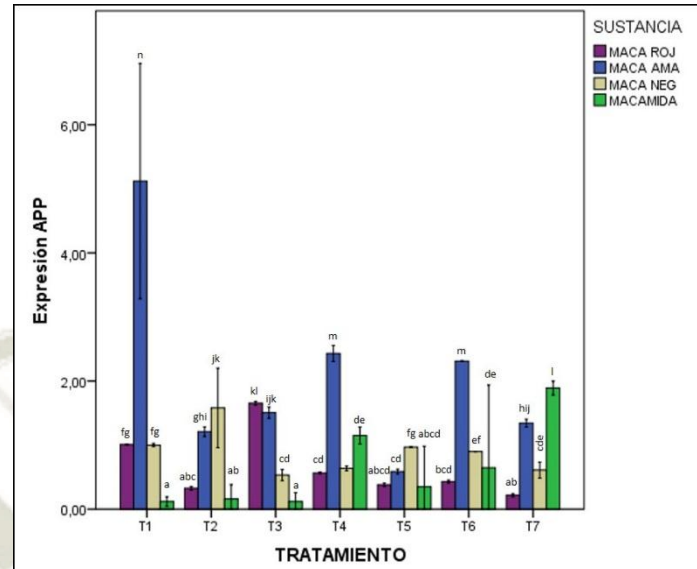


Figura 23 Expresión del gen APP en células SH-SY5Y, expuestas a distintos tipos de tratamiento

En la Tabla N° 22 encontramos diferencias estadísticamente significativas cuando se trabajó entre diferentes sustancias (ecotipos de maca y M75), así como también hay diferencias entre cuando se trabaja con diferentes tratamientos analizando la expresión de APP.

Tabla 22 Análisis de varianza multifactorial para la expresión del gen APP en células SH-SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo corregido	84.205 ^a	27	3.119	89.774	0.00
Intersección	94.881	1	94.881	2731.215	0.00
SUSTANCIA	29.388	3	9.796	281.988	0.00
TRATAMIENTO	10.735	6	1.789	51.505	0.00
SUSTANCIA * TRATAMIENTO	44.081	18	2.449	70.495	0.00
O Error	1.945	56	0.035		
Total	181.032	84			
Total corregido	86.151	83			

a. R al cuadrado = ,962 (R al cuadrado ajustada = ,945)

En la Tabla N° 23, se observa las comparaciones múltiples en la expresión del gen APP de células SH-SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento y sustancias. Donde podemos inferir que el ecotipo maca negra(Sustancia) y M75(Sustancia) reducen los niveles de expresión del gen APP mucho más que los otros grupos.

Tabla 23 Comparaciones múltiples para la expresión del gen APP en células SH-SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento y sustancia

		Expresión	Desviación Estándar
Maca Roja	Blanco + DMSO	1.01+/- 1.02 ^a	0.00
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.33+/-0.09 ^b	0.0115
	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	1.65+/-0.45 ^c	0.0115
	DMSO + B-A 24h	0.57+/-0.01 ^d	0.0058
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.38+/- ^e 0.15	0.01
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	0.43+/- ^f 0.07	0.01
	Cel + DMSO + B-A 48h	0.22+/- ^g 0.09	0.0104
Maca Amarilla	Blanco + DMSO	5.12+/-0.12 ^c	0.74
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	1.21+/- ^d 0.23	0.03
	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	1.51+/-0.02 ^a	0.0351
	DMSO + B-A 24h	2.43+/-0.98 ^{ab}	0.05
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.59+/-0.55 ^c	0.0153
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	2.31+/- 0.33 ^{bc}	0.00
	Cel + DMSO + B-A 48h	1.34+/-0.11 ^a	0.0252
Maca Negra	Blanco + DMSO	1.0+/-0.16 ^d	0.01
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	1.58+/-0.54 ^{ab}	0.25

	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	0.53+/-0.12 ^b	0.0351
	DMSO + B-A 24h	0.64+/-0.42 ^c	0.0153
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.97+/-0.87 ^a	0.00
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	0.9+/-0.10 ^c	0.00
	Cel + DMSO + B-A 48h	0.61+/-0.76 ^{ab}	0.05
M75	Blanco + DMSO	0.12+/-0.28 ^a	0.03
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.16+/-0.64 ^a	0.09
	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	0.12+/-0.44 ^a	0.0557
	DMSO + B-A 24h	1.15+/-0.23 ^b	0.0529
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.35+/-0.45 ^a	0.2553
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	0.65+/-0.21 ^{ab}	0.5200
	Cel + DMSO + B-A 48h	1.89+/-0.98 ^c	0.0436

El gen PSEN1 cuando fue analizado para saber cómo respondían los diferentes tratamientos combinados con diferentes Sustancias (3 ecotipos de maca y M75), nos muestra que en cuanto al T1 la expresión que genera M75, maca amarilla y negra sobre el gen PSEN1 son casi muy bajas y estas son iguales. Para los T2, T3, T5 y T6 la maca negra presenta niveles mínimos de expresión, así como también para M75 (Figura N°24)

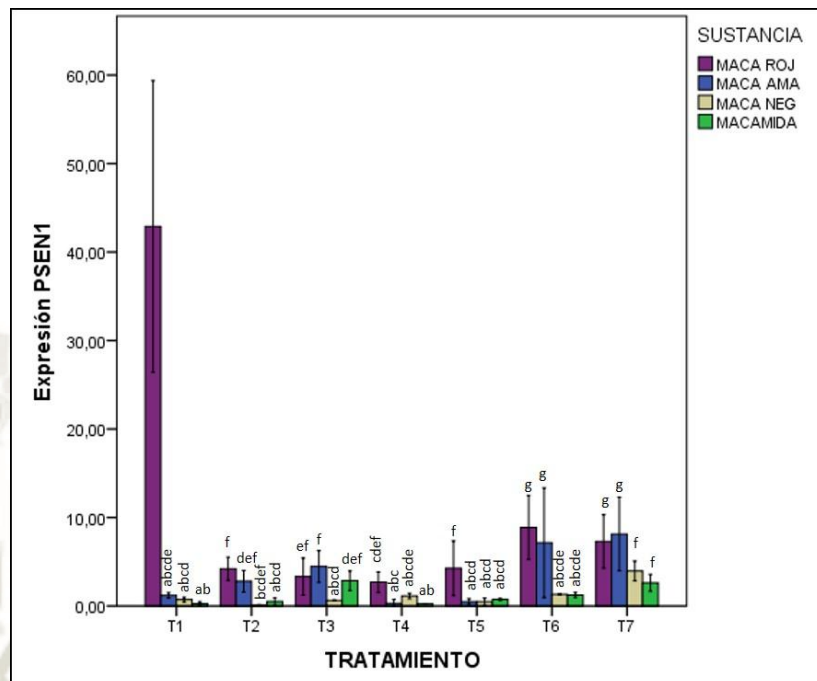


Figura 24 Expresión del gen PSEN1 en células SH-SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento

En la Tabla N° 24 encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.5$) cuando se trabaja con diferentes tipos de maca (sustancia) y diferentes tratamientos.

Tabla 24 Análisis de varianza multifactorial para la expresión del gen PSEN1 en células SH-SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo corregido	5215.281 _a	27	193.159	88.828	0.00
Intersección	141.286	1	1412.286	649.471	0.00
SUSTANCIA	1222.628	3	407.543	187.418	0.00
TRATAMIENTO	910.819	6	151.803	69.810	0.00
SUSTANCIA * TRATAMIENTO	3081.834	18	171.213	78.736	0.00
Error	121.773	56	2.175		
Total	6749.340	84			
Total corregido	5337.054	83			

a. R al cuadrado = ,962 (R al cuadrado ajustada = ,945)

En la Tabla N° 25 se observa las comparaciones múltiples en la expresión del gen PSEN1 de células SH-SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento y sustancias. Se ha encontrado en la data que el ecotipo maca negra(Sustancia) y M75(Sustancia) reducen los niveles de expresión del gen PSEN1 mucho más que los otros grupos.

Tabla 25 Comparaciones múltiples para la expresión del gen APP en célula SH-SY5Y expuestas a distintos tipos de tratamiento y sustancia

		Expresión	Desviación Estándar
Maca Roja	Blanco + DMSO	42.89+/-16.48 ^c	6.6350
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	4.21+/-1.31 ^{ab}	0.5283
	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	3.32+/-2.10 ^a	0.8450
	DMSO + B-A 24h	2.69+/-1.16 ^a	0.4686
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	4.26+/-3.09 ^{ab}	1.2450
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	8.88+/-3.62 ^b	1.4552
	Cel + DMSO + B-A 48h	7.28+/-3.03 ^{ab}	1.2186
	Maca Amarilla	Blanco + DMSO	1.19+/-0.3 ^{ab}
Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h		2.8+/-1.22 ^{bc}	0.4891
Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h		4.46+/-1.79 ^c	0.7215
DMSO + B-A 24h		0.29+/-0.46 ^a	0.1850
Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h		0.49+/-0.33 ^a	0.1343
Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h		7.15+/-6.2 ^d	2.4950
Cel + DMSO + B-A 48h		8.13+/-4.15 ^d	1.6716
Maca Negra	Blanco + DMSO	0.72+/-0.26 ^b	0.1050
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.11+/-0.02 ^a	0.0100

	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	0.62+/-0.01 ^b	0.0058
	DMSO + B-A 24h	1.13+/-0.3 ^c	0.1200
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.47+/-0.41 ^b	0.1650
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	1.31+/-0.01 ^c	0.0058
	Cel + DMSO + B-A 48h	3.95+/-1.12 ^d	0.4508
	Blanco + DMSO	0.25+/-0.22 ^a	0.0896
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.49+/-0.43 ^{ab}	0.1750
	Cel +Sust(10ug/ml) + B-A 24h	2.84+/-1.13 ^d	0.4531
	DMSO + B-A 24h	0.24+/-0.01 ^a	0.0058
M75	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.75+/-0.10 ^b	0.0400
	Cel +Sust (10ug/ml) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	1.24+/-0.27 ^c	0.1100
	Cel + DMSO + B-A 48h	2.61+/-0.95 ^d	0.3837

Comparaciones hechas Entre los tratamientos para cada tipo de sustancia.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

CONCLUSIONES

1. Se logró evaluar el efecto de tres ecotipos de *Lepidium meyenii* y N-benciloctadecadienamida (M75), en la expresión genética de PSEN1, BACE1 y APP en células in vitro de neuroblastoma humano SH-SY5Y frente al efecto producido por β -Amiloide.
2. El péptido β -Amiloide genera estrés en las células SH-SY5Y, así como también incrementa los niveles de expresión en los genes APP (6.45-13.98 veces) BACE1(9.71 – 238 veces) y PSEN1 (6.75-20.44 veces)
3. Los ecotipos de maca (amarilla, negra y roja) empleados en el presente trabajo, disminuyen la sobreexpresión genética de APP, BACE1 y PSEN1 generada por el péptido β -Amiloide. Así también la Expresión génica de APP, BACE1 y PSEN1 de células SH-SY5Y, presenta un incremento mínimo con respecto a su gen de referencia GAPDH, se encontraron valores 0.01 hasta 4.09 veces. Se ha identificado que el gen APP, disminuye su expresión 5.3 veces cuando se administra maca amarilla (0.5ug/ml) por 24 horas, así como 10.9 veces cuando se aplica el co tratamiento incubando por 48 horas con maca a 0.5ug/mL. EL gen BACE1 presenta mejor respuesta con maca negra, reduciendo 12.6 veces (0.5ug/ml) y 25.5 veces(10ug/ml), en cuanto al gen PSEN1 también la maca negra presento mejor respuesta, reduciendo 125.9 veces (0.5ug/ml) y 22.3 veces(10ug/ml), incubando por 24 horas. El ecotipo maca negra, en el gen APP tuvo una mejor respuesta a una concentración de 10ug/ml, reduciendo la expresión genética hasta en 12.1 veces. En el gen BACE1 la concentración de 0.5ug/ml y 10ug/ml de maca negra tuvieron una respuesta similar reduciendo la expresión genética entre 53.9 y 42.2 veces. En cuanto al gen PSEN1 la maca negra también presento mejores resultados, reduciendo 29.4 y 10.9 veces.
4. N-benciloctadecadienamida (M75), empleado como Co-Tratamiento tiene un efecto positivo en la disminución de la expresión génica inducida por β -Amiloide, la respuesta de esta macamida sintética es muy parecida en cuanto a resultado cuando se trabaja

incubando por 24 y 48 horas, las concentraciones empleadas de M75 (0.5 y 10ug/ml),
presentan una respuesta muy parecida.



SUGERENCIAS

1. Se recomienda seguir estudios moleculares analizando otros genes relacionados con enfermedades neurodegenerativas como los genes IL-1, BACE2 y APOE.
2. Mutaciones en los genes APOE y APP son importantes en el diagnóstico de enfermedades neurodegenerativas, se recomienda iniciar una línea de investigación en este tema.
3. Se recomienda ampliar investigaciones en la producción de Especies Reactivas de Oxígeno (EROS) inducidas por el péptido β -Amiloide.



BIBLIOGRAFIA

1. Hewson, H.J. 1981. The Genus *Lepidium* L. (Brassicaceae) in Australia. *Brunonia* 4: 217308
2. Lee, J-Y.; Mummenhoff, K.; Bowman, J.L. 2002. Allopolyploidization and evolution of species with reduced floral structures in *Lepidium* L. (Brassicaceae) *PNAS*, 99: 16835 – 16840
3. Mummenhoff, K.; Kuhnt, E.; Koch, M; Zunk, K. 1995. Systematic implications of chloroplast DNA variation in *Lepidium* sections *Cardamon*, *Lepiocardamon* and *Lepia* (Brassicaceae). *Plant Systematics and Evolution* 196: 75-88
4. Thellung, A. 1906. Die Gattung *Lepidium* (L.) R. Br. Eine monographische Studie. *Neue Denkschrift Allgemeinen Schweizerischen Naturforscher Gesellschaft* 41: 1-340
5. Al-Shehbaz, I.A. 1986a. New wool-alien Cruciferae (Brassicaceae) in North America: *Lepidium* and *Sisymbrium*. *Rhodora* 88: 347356.
6. Al-Shehbaz, I.A. 1986b. The genera of *Lepidieae* (Cruciferae; Brassicaceae) in southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 67: 265-311.
7. Rea, J. 1994. Andean roots – Maca. In: J.E. Hernándo Bermejo and J. León (eds.). *Neglected Crops: 1492 from a Different Perspective*. 1994. *Plant Production and Protection Series No. 26*. FAO, Rome, Italy. 149–163
8. Aliaga, R. 2004. Maca (*Lepidium meyenii*). In: Seminario, J. (ed.) *Raíces Andinas - Contribuciones al conocimiento y a la capacitación*, 361-366
9. Dostert N, y col., *Desarrollo de monografías botánicas (factsheets) para cinco cultivos peruanos Hojas Botánicas: Maca – Lepidium meyenii Walp.* 2009
10. Callapiña V.,(Tesis Pre Grado) Efecto neuroprotector de extracto de *Lepidium meyenii* “maca” en células de neuroblastoma (SH-SY5Y) con estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno
11. Hansen H., Ikonomidou, P. Bittigau, S. Hansen. accumulation of the anandamide precursor and other n-acyl ethanolamine phospholipids in infant rat models of in vivo necrotic and apoptotic neuronal death. *J. Neurochem.* 76, 39, (2001)-TESIS
12. Watson. J., *Biología Molecular del Gen VII* Edición. 2015

13. Mullis K. Primer-Direct Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science. 1987;39.
14. Life Technologies, Real Time PCR Handbook.
15. Bogani, P.; Simonini, F.; Iriti, M.; Rossoni, M.; Faoro, F.; Poletti, A.; Visioli, F. 2006. *Lepidium meyenii* (maca) does not exert direct androgenic activities. Journal of Ethnopharmacology 104: 415–417.
16. Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiol Rev. 2001 Apr;81(2):741-66.
17. Skovronsky DM., Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. J Biol Chem. 2000 Jan 28;275(4):2568-75.
18. Vassar, R., BACE1: the beta-secretase enzyme in Alzheimer's disease. Send to J Mol Neurosci. 2004;23(1-2):105-14.
19. Shipley, M.; Mangold, C. A.; Szpara, M. L. Differentiation of the shsy5y human neuroblastoma cell line. J. Vis. Exp. 2016
20. Xie, H. R.; Hu, L. S.; Li, G. Y. Sh-sy5y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in parkinson's disease. Chin. Med. J. (engl). 2010
21. Muse™ Count & Viability Kit User's Guide. MERCK
22. EasyScript RT and cDNA kit_SL1213.pdf.
23. Schrotter A. The Amyloid Precursor Protein (APP) Family Members are Key Players in S-adenosylmethionine Formation by MAT2A and Modify BACE1 and PSEN1 Gene Expression-Relevance for Alzheimer's Disease. 2012 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology
24. Brar N. The effect of cannabinoids on APP, BACE1, and ApoE mRNA expression. Studies by Undergraduate Researchers at Guelph (SURG)
25. Gonzales, G. "Ethnobiology and ethnopharmacology of *lepidium meyenii* (*lepidium meyenii* "maca"), a plant from the peruvian highlands". Evidence-based complementary and alternative medicine, pp. 1-10, 2012 (5)
26. Pino-figueroa, A.; Bohlke, M.; d. Maher, T. *lepidium meyenii* "maca": a review on its phytochemical and pharmacological profile" mechanism and action of phytoconstituents, , pp, 9-27,2011 6

27. Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P; Schettino, o. “Chemical composition of lepidium meyenii” food chemistry, pp. 347-349, 1994. 7
28. Selkoe, D. J. (1997) in *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease* (Rosenberg, R. N., Prusiner, S. B., DiMauro, S., and Barchi, R. L., eds) pp. 601–612, Butterworth-Heinemann, Boston
29. Bisogno T, Di Marzo V. 2008. The role of the endocannabinoid system in Alzheimer’s disease: facts and hypotheses. *Current Pharmaceutical Design*. 14(23): 2299-3305.
30. Bosier B, Tilleux S, Najimi M, Lambert DM, Hermans E. 2007. Agonist selective modulation of tyrosine hydroxylase expression by cannabinoid ligands in a murine neuroblastoma cell line. *Journal of Neurochemistry*. 102(6): 1996-2007.
31. Acquati F., Accarino M., Nucci C., Fumagalli P., Jovine L., Ottolenghi S., and Taramelli R. (2000) The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Lett*. 468, 59–64.
32. Bennett B. D., Babu-Khan S., Loeloff R., Louis J.-C., Curran E., Citron M., and Vassar R. (2000a) Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues. *J. Biol. Chem*. 275, 20647–20651.
33. Bennett B. D., Denis P., Haniu M., Teplow D. B., Kahn S., Louis J.-C., et al. (2000b) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer’s β -secretase. *J. Biol. Chem*. 275, 37712–37717
34. Bodendorf U., Fischer F., Bodian D., Multhaup G., and Paganetti P. (2001) A splice variant of β -secretase deficient in the amyloidogenic processing of the amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem*. 276, 12019–12023.
35. Buxbaum J. D., Liu K. N., Luo Y., Slack J. L., Stocking K. L., Peschon J. J., et al. (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem*. 273, 27765–27767.
36. Cai H., Wang Y., McCarthy D., Wen H., Borchelt D. R., Price D. L., and Wong P. C. (2001) BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat. Neurosci*. 4, 233–234.

37. Citron M., Diehl T. S., Capell A., Haass C., Teplow D. B., and Selkoe D. J. (1996) Inhibition of amyloid β -protein production in neural cells by the serine protease inhibitor AEBSF. *Neuron* 17, 171–179.
38. Citron M., Teplow D. B., and Selkoe D. J. (1995) Generation of amyloid β -protein from its precursor is sequence specific. *Neuron* 14, 661–670.
39. Farzan M., Schnitzler C. E., Vasilieva N., Leung D., and Choe H. (2000) BACE2, a β -secretase homolog, cleaves at the β site and within the amyloid- β region of the amyloid- β precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9712–9717.
- 40.
41. Hebert LE, Weuve J, Scherr PA, Evans DA. 2013. Alzheimer disease in the United States (2010-2050) estimated using the 2010 census. *Neurology*. 80(19): 1778-1783.
42. Cole SL, Vassar R. 2008. The role of amyloid precursor protein processing by BACE1, the β -secretase, in Alzheimer disease pathophysiology. *Journal of Biological Chemistry*. 283(44): 29621-29625.
43. Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Daniel Lee CY, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ, Brunden KR, Wilson DA, Landreth GE. 2012. ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science*. 335(6075): 1503-1506.
44. Donnelly RJ, Friedhoff AJ, Beer B, Blume AJ, Vitek MP. 1990. Interleukin-1 stimulates the beta-amyloid precursor protein promoter. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 10(4): 485-495.
45. Eubanks LM, Rogers CJ, Beuscher AE, Koob GF, Olson AJ, Dickerson, TJ, Janda KD. 2006. A molecular link between the active component of Marijuana and Alzheimer's disease pathology. *Molecular Pharmaceutics*. 3(6): 773-777.
46. Harvey BS, Ohlsson KS, Maag JLV, Musgrave IF, Smid SD. 2012. Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid- β evoked neurotoxicity in vitro. *Neurotoxicology*. 33(2): 138-146.
47. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG. 2002. International Union of Pharmacology: XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*. 54(2): 161–202.

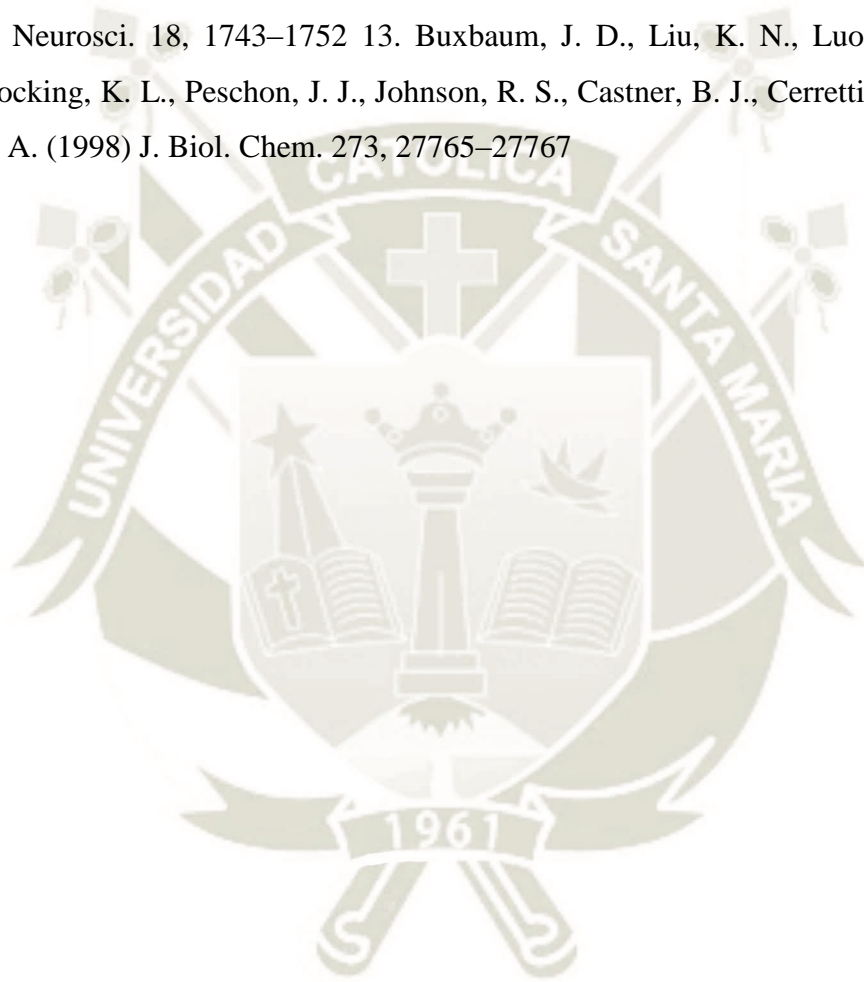
48. Ly PTT, Wu Y, Zou H, Wang R, Zhou W, Kinoshita A, Zhang M, Yang Y, Cai F, Woodgett J, Song W. 2013. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *The Journal of Clinical Investigation*. 123 (1): 224-235.
49. Martín-Moreno AM, Brera B, Spuch C, Carro E, GarcíaGarcía L, Delgado M, Pozo MA, Innamorato NG, Cuadrado A, de Ceballos ML. 2012. Prolonged oral cannabinoid administration prevents neuroinflammation, lowers β -amyloid levels and improves cognitive performance in Tg App 2576 mice. *Journal of Neuroinflammation*. 9(8).
50. Mechoulam R, Parker LA. 2013. The endocannabinoid system and the brain. *Annual Review of Psychology*. 64: 21-47. Muguruza C, Lehtonen M, Altonen N, Morentin B, Meana JJ, Callado LF. 2013. Quantification of endocannabinoids in postmortem brain of schizophrenic subjects. *Schizophrenia Research*. 148(1-3): 145-150.
51. Ortega-Gutiérrez S, Molina-Holgado E, Guaza C. 2005. Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia*. 52(2): 163-168.
52. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Di Marzo V, Elphick MR, Greasley PJ, Hansen HS, Kunos G, Mackie K, Mechoulam R, Ross RA. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacological Reviews*. 62(4): 588-631.
53. . Zheng, H., and Koo, E. H. (2006) The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol. Neurodegener.* 1, 5 2.
54. Mu" ller, T., Meyer, H. E., Egensperger, R., and Marcus, K. (2008) The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-Relevance for Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 85, 393– 406 3.
55. Nikolaev, A., McLaughlin, T., O'Leary, D. D., and Tessier-Lavigne, M. (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457, 981–989 4.
56. Mu" ller, T., Concannon, C. G., Ward, M. W., Walsh, C. M., Tirniceriu, A. L., Tribl, F., Kogel, D., Prehn, J. H., and Egensperger, R. (2007) Modulation of Gene Expression and

- Cytoskeletal Dynamics by the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain (AICD). *Mol. Biol. Cell* 18, 201–210 5.
57. Furukawa, K., Sopher, B. L., Rydel, R. E., Begley, J. G., Pham, D. G., Martin, G. M., Fox, M., and Mattson, M. P. (1996) Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J. Neurochem.* 67, 1882–1896 6. Eggert, S., Paliga, K., Soba, P., Evin, G., Masters, C. L., Weidemann, A., and Beyreuther, K. (2004)
 58. The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 279, 18146–18156 7. Herms, J., Anliker, B., Heber, S., Ring, S., Fuhrmann, M., Kretzschmar, H., Sisodia, S., and Müller, U. (2004)
 59. Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J.* 23, 4106–4115 8.
 60. Ring, S., Weyer, S. W., Kilian, S. B., Waldron, E., Pietrzik, C. U., Filippov, M. A., Herms, J., Buchholz, C., Eckman, C. B., Korte, M., Wolfer, D. P., and Müller, U. C. (2007) The secreted beta-amyloid precursor protein ectodomain APPs alpha is sufficient to rescue the anatomical, behavioral, and electrophysiological abnormalities of APP-deficient mice.
 61. Wang, P., Yang, G., Mosier, D. R., Chang, P., Zaidi, T., Gong, Y. D., Zhao, N. M., Dominguez, B., Lee, K. F., Gan, W. B., and Zheng, H. (2005) Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J. Neurosci.* 25, 1219–1225 10. Bergmans, B. A., Shariati, S. A., Habets, R. L., Verstreken, P., Schoonjans, L., Müller, U., Dotti, C. G., and De, S. B. (2010) Neurons generated from APP/APLP1/APLP2 triple knockout embryonic stem cells behave normally in vitro and in vivo: lack of evidence for a cell autonomous role of the amyloid precursor protein in neuronal differentiation. *Stem Cells* 28, 399–406 11.
 63. Schrenk-Siemens, K., Perez-Alcala, S., Richter, J., Lacroix, E., Rahuel, J., Korte, M., Müller, U., Barde, Y. A., and Bibel, M. (2008) Embryonic stem cell-derived neurons as a cellular system to study gene function: lack of amyloid precursor proteins APP and APLP2 leads to defective synaptic transmission. *Stem Cells* 26, 2153–2163 12.

64. Lannfelt, L., Basun, H., Wahlund, L. O., Rowe, B. A., and Wagner, S. L. (1995) Decreased alpha-secretase-cleaved amyloid precursor protein as a diagnostic marker for Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 1, 829 – 832 13. Nakaya, T., and Suzuki, T. (2006) Role of APP phosphorylation in FE65-dependent gene transactivation mediated by AICD. *Genes Cells* 11, 633– 645 14.
65. Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402– 408 15.
66. Müller, T., Loosse, C., Schroö tter, A., Schnabel, A., Helling, S., Egensperger, R., and Marcus, K. (2011) The AICD interacting protein DAB1 is upregulated in Alzheimer frontal cortex brain samples and causes deregulation of proteins involved in gene expression changes. *Curr. Alzheimer Res.* 8, 573–582 16.
67. Spitzer, P., Klafki, H. W., Blennow, K., Buee, L., Esselmann, H., Herruka, S. K., Jimenez, C., Klivenyi, P., Lewczuk, P., Maler, J. M., Markus, K., Meyer, H. E., Morris, C., Muller, T., Otto, M., Parnetti, L., Soininen, H., Schraen, S., Teunissen, C., Vecsei, L., Zetterberg, H., and Wilfang, J. (2010) cNEUPRO: novel biomarkers for neurodegenerative diseases. *Int. J. Alzheimers. Dis.* pii, 548145 17.
68. Reidegeld, K. A., Eisenacher, M., Kohl, M., Chamrad, D., Korting, G., Blü ggel, M., Meyer, H. E., and Stephan, C. (2008) An easy-to-use Decoy Database Builder software tool, implementing different decoy strategies for false discovery rate calculation in automated MS/MS protein identifications. *Proteomics.* 8, 1129 –1137 18.
69. Müller, T., Schroö tter, A., Loosse, C., Helling, S., Stephan, C., Ahrens, M., Uszkoreit, J., Eisenacher, M., Meyer, H. E., and Marcus, K. (2011) Sense and nonsense of pathway analysis software in proteomics. *J. Proteome. Res.* 10, 5398 –5408 19.
70. Benjamni, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B* 57, 289 –300 20.
71. Braak, H., and Braak, E. (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82, 239 –259 21.
72. Mirra, S. S., Heyman, A., McKeel, D., Sumi, S. M., Crain, B. J., Brownlee, L. M., Vogel, F. S., Hughes, J. P., van Belle, G., and Berg, L. (1991) The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part

- II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 41, 479 – 486 22.
71. Katoh, Y., Ikura, T., Hoshikawa, Y., Tashiro, S., Ito, T., Ohta, M., Kera, Y., Noda, T., and Igarashi, K. (2011) Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. *Mol. Cell* 41, 554 –566 23. Panza, F., Frisardi, V., Capurso, C., D'Introno, A., Colacicco, A. M., Vendemiale, G., Capurso, A., and Solfrizzi, V. (2009) Possible role of Sadenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and polyunsaturated fatty acids in predementia syndromes and Alzheimer's disease. *J. Alzheimers. Dis.* 16, 467– 470 24.
72. Kim, S. H., Fountoulakis, M., Cairns, N., and Lubec, G. (2001) Protein levels of human peroxiredoxin subtypes in brains of patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *J. Neural Transm.* 61, 223–235 25.
73. Morrison, L. D., Smith, D. D., and Kish, S. J. (1996) Brain S-adenosylmethionine levels are severely decreased in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 67, 1328 –1331
74. Xu, H., Sweeney, D., Wang, R., Thinakaran, G., Lo, A. C., Sisodia, S. S., Greengard, P., and Gandy, S. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3748–3752 3.
75. Cook, D. G., Forman, M. S., Sung, J. C., Leight, S., Kolson, D. L., Iwatsubo, T., Lee, V. M.-Y., and Doms, R. W. (1997) *Nat. Med.* 3, 1021–1023 4.
76. Hartmann, T., Bieger, S. C., Bruhl, B., Tienari, P. J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G. W., Masters, C. L., Dotti, C. G., Unsicker, K., and Beyreuther, K. (1997) *Nat. Med.* 3, 1016–1020 5.
77. Wild-Bode, C., Yamazaki, T., Capell, A., Leimer, U., Steiner, H., Ihara, Y., and Haass, C. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 16085–16088 6.
78. Skovronsky, D. M., Doms, R. W., and Lee, V. M.-Y. (1998) *J. Cell Biol.* 141, 1031–1039 7. Sisodia, S. S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 6075–6079 8. Citron, M., Oltersdorf, T., Haass, C., McConlogue, L., Hung, A. Y., Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Lieberburg, I., and Selkoe, D. J. (1992) *Nature* 360, 672–674 9.
79. Scheuner, D., Eckman, C., Jensen, M., Song, X., Citron, M., Suzuki, N., Bird, T. D., Hardy, J., Hutton, M., Kukull, W., Larson, E., Levy-Lahad, E., Viitanen, M., Peskind, E., Poorkaj, P., Schellenberg, G., Tanzi, R., Wasco, W., Lannfelt, L., Selkoe, D., and Younkin, S. (1996) *Nat. Med.* 2, 864–870 10.

80. Caporaso, G. L., Gandy, S. E., Buxbaum, J. D., Ramabhadran, T. V., and Greengard, P. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 3055–3059 11.
81. Buxbaum, J. D., Koo, E. H., and Greengard, P. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 9195–9198 12.
82. Savage, M. J., Trusko, S. P., Howland, D. S., Pinsker, L. R., Mistretta, S., Reaume, A. G., Greenberg, B. D., Siman, R., and Scott, R. W. (1998)
83. *J. Neurosci.* 18, 1743–1752 13. Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P., and Black, R. A. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 27765–27767



ANEXO 1

Universidad Católica de Santa María

Escuela de Postgrado

Maestría en Bioquímica y Biología Molecular



“EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE TRES ECOTIPOS DE *Lepidium meyenii* (MACA) Y N-BENCILOCTADECADIENAMIDA EN LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE PSEN1, BACE1 Y APP EN CÉLULAS *in vitro* DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y”

Tesis presentada por el Bachiller:
Carpio Carpio, José Miguel

Para optar el Grado Académico de:
Maestro en Bioquímica y Biología Molecular

Asesor: PhD. Villanueva Salas José

Arequipa – Perú

2018

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Enunciado del Problema

El estrés desarrollado en la Enfermedad del Alzheimer producido por la producción de B-Amiloide genera respuestas en la expresión de genes que están relacionados con dicha enfermedad, estas respuestas pueden provocar, sobre expresión genética o inhibición del funcionamiento correcto de dichos genes, estos cambios son factores clave implicados en la etiología de enfermedades neuronales como el Alzheimer.

1.2. Descripción del Problema

La patogénesis de la enfermedad de Alzheimer implica factores etiológicos complejos, de los cuales la deposición de la proteína beta-amiloide ($A\beta$), han sido fuertemente implicada. La proteína $A\beta$, es la encargada de formar neurofibrillas y/o placas responsables del mal funcionamiento de las neuronas, desencadenando la neurodegeneración celular accionando finalmente la enfermedad del Alzheimer (EA). La proteína $A\beta$, capaz de generar estrés neuronal y con ello generar la activación de radicales libres que dañan finalmente las neuronas por un proceso de neurotoxicidad, así también se sabe que los genes que están relacionados con la EA (BACE1, PSEN1 y APP), se ven alterados desarrollando sobreexpresión o inhibición de su función, esto puede llevar a desarrollar con mayor rapidez esta enfermedad neurodegenerativa.

1.3. Justificación del Problema

Como se ha indicado antes, las características patológicas de la EA son la presencia de placas seniles extracelulares principalmente compuestas del péptido β -amiloide ($A\beta$), la aparición de ovillos neurofibrilares intracelulares constituidos por agregados hiperfosforilados de la proteína tau asociada a microtúbulos, la masiva pérdida neuronal y conectividad alterada. El signo clínico más temprano de la EA es la pérdida de la memoria episódica (dependiente del hipocampo) como resultado de cambios en la función sináptica más que en la pérdida neuronal. Este error sináptico es un evento temprano en la patogénesis que puede ser detectado en los pacientes con deterioro cognitivo leve.

En un trabajo de la Universidad Balarica, en España indicaron que de la EA es principalmente una patología esporádica, aunque también son conocidas formas raras de tipo familiares con herencia autosómica dominante (EA familiar, EAf). La observación de que la presencia de una copia extra del cromosoma 21, que causa el Síndrome de Down, conduce a una demencia con neuropatología similar a EA, dirigió las sospechas hacia el cromosoma 21 como un posible locus responsable de la EAf. Posteriormente, en el gen que codifica la proteína precursora amiloide (APP) en el cromosoma 21, fue identificada la primera mutación responsable para EAf.

Más adelante fueron identificados otros dos genes como responsables de la EA: la presenilina 1 (PSEN1) en el cromosoma 14 y la presenilina 2 (PSEN2) en el cromosoma 1. Las mutaciones en estos tres genes son responsables de la mayoría de los casos familiares de aparición temprana de EA y numerosas mutaciones en la APP y en los genes PSEN1 y PSEN2 se han descrito en todo el mundo. La mutación en uno de estos genes conduce al desarrollo de la EA con una penetrancia cercana al 100%. Además de estos “genes EA”, el alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (apoE) se ha identificado como un factor de riesgo o un gen de susceptibilidad de la EA. La apoE está involucrado en el metabolismo de lipoproteínas y la homeostasis del colesterol en el cerebro, y hay tres isoformas diferentes de la proteína (E2, E3 y E4), que son codificadas por tres alelos diferentes: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, respectivamente. Los portadores del alelo $\epsilon 4$ de la apoE tienen un riesgo dosis-dependiente de desarrollar EA, por otra parte, los individuos homocigotos para el alelo $\epsilon 4$ de la apoE generalmente desarrollarán EA antes de los individuos heterocigotos.

Son muchos los trabajos de investigación en los que se ha trabajado en base a mutaciones presentes en los genes más importantes relacionados con el Alzheimer y que dichas mutaciones aceleran el proceso neurodegenerativo.

Es de suma importancia que se pueda conocer que sucede con estos genes a nivel de su expresión, así como también conocer la capacidad de nuestros recursos naturales como la Maca, que probablemente pueda tener efecto Neuroprotector, en el Perú al no haber datos reportados sobre dicho efecto y la influencia favorable en la expresión genética en la enfermedad del Alzheimer, se necesitan ensayos moleculares para

evaluar los riesgos y beneficios de las terapias antioxidantes para las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

2. VARIABLES E INDICADORES

VARIABLES	INDICADORES
Variable Independiente	
Cultivo de Neuroblastoma	Número o densidad de neuronas necesarias para las distintas evaluaciones
B-Amiloide	Concentración: Se colocó ciertas concentraciones conocidas de B-Amiloide para evaluar la cantidad de muerte que provoca. Variable cuantitativa continua, la cual puede tomar valores de 0.5 μ M y 10uM.
	Tiempo: La exposición a una concentración fija de B-Amiloide, para evaluar el efecto sobre la expresión genética al transcurrir el tiempo. Es una variable cuantitativa continua, toma valores de 24horas.
Variable Dependiente	
Expresión Genética	Es una variable cuantitativa,

3. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Herrera, M., en el 2013 investigo la expresión de tau, APP, nicastrina, betasecretasa y genes asociados, en leucocitos, como marcadores de la enfermedad de Alzheimer, el presente trabajo se enfocó en analizar tau, APP, nicastrina, β -secretasa y algunos genes que se relacionan estrechamente con éstos, utilizando datos de expresión y genotipo así como factores de riesgo frecuentes en la población adulta, para investigar marcadores potenciales de la enfermedad de Alzheimer y generar clasificadores para ella. Los resultados demuestran que los niveles de expresión de tau, APP, nicastrina, β secretasa y genes que se relacionan con éstos, obtenidos en leucocitos, generan patrones específicos para la EA y, por tanto, son de utilidad diagnóstica.

Muñoz, T., en el 2010, puso de manifiesto que el estrés oxidativo afecta al metabolismo/procesamiento de la proteína APP y que este hecho podría tener relación con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. Porque la expresión de APP mutante sensibiliza a la muerte neuronal inducida por el estrés oxidativo y porque este regula el metabolismo/procesamiento de la proteína, de una manera anómala en el caso del APP mutante.

En el año 2009, S., Manzano trabajo con modelos animales en la enfermedad del Alzheimer, en donde consiguió replicar los síntomas y las lesiones responsables de la EA. Citando genes muy importantes en el metabolismo de la proteína precursora del amiloide (APP) (APP humana-wild type wt- o las formas mutadas), otros basados en la presenilina (PSEN) (ratones transgénicos que sobre expresan la forma wild-type o las mutadas), los dobles mutantes PS/APP. Otros basados en la proteína tau (tau-JNPL3) y los triples transgénicos PSEN/APP/tau.).

Álvarez, J. realizo estudio sobre biomarcadores en la enfermedad del Alzheimer, en donde indica que gracias a los avances en el conocimiento molecular de la enfermedad se ha podido estratificar a los enfermos dependiendo de la etiología, sobre todo por el descubrimiento de los genes APP, PSEN-1 y PSEN-2, ya que sus mutaciones abarcan más del 50 % de todas las producen enfermedad mediante herencia dominante, y por ello se pueden utilizar como biomarcadores para el diagnóstico.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

- Evaluar efecto de los extractos de *Lepidium meyenii* (maca) en la expresión genética de *pSEN1*, *BACE1* y *APP* en células de neuroblastoma humano

Objetivos Específicos

- Exponer células in vitro SH-SY5Y de neuroblastoma humano a 2 concentraciones de beta-amiloide ($A\beta$).
- Tratar células in vitro SH-SY5Y de neuroblastoma humano con 2 concentraciones de Maca Amarilla.
- Tratar células in vitro SH-SY5Y de neuroblastoma humano con 2 concentraciones de Maca Roja.
- Tratar células in vitro SH-SY5Y de neuroblastoma humano con 2 concentraciones de Maca Negra.
- Cuantificar la expresión de los genes *BACE1*, *PSEN1* y *APP* en células de neuroblastoma expuestas a beta-amiloide ($A\beta$) y tratadas con Maca Amarilla.
- Cuantificar la expresión de los genes *BACE1*, *PSEN1* y *APP* en células de neuroblastoma expuestas a beta-amiloide ($A\beta$) y tratadas con Maca Roja.
- Cuantificar la expresión de los genes *BACE1*, *PSEN1* y *APP* en células de neuroblastoma expuestas a beta-amiloide ($A\beta$) y tratadas con Maca Negra.

5. Hipótesis

- *Lepidium meyenii* (Maca) puede tener efecto en la expresión de genes implicados en el Alzheimer. Es probable que los radicales libres producidos por el B-Amiloide sean inhibidos o reduzcan su concentración administrando extractos de tres variedades de Maca.

6. Planteamiento Operativo

Se cultivarán células de neuroblastoma SH-SY5Y (3×10^5 células/ml) en medio específico DMEM enriquecido con suero fetal bovino al 10% y 1% de y penicilina estreptomycin, dichas células se sembraran en Falsck para cultivo (Coastar) de 5ml, luego serán incubadas a 37°C y 5% de CO_2 . Transcurridas 48 horas y de haber alcanzado confluencia y diferenciación al 80%, las células serán sometidas al B-Amiloide el cual producirá un daño en las células neuronales, las concentraciones a las que se trabajaran será de 0.5 μM y 10 μM . El tiempo de exposición será por 24 horas. Luego serán tratadas con 2 concentraciones de Maca (0.5ppm y 10ppm) y dejadas a incubación por un espacio de 24 horas a condiciones de 37°C y 5% de CO_2 .

Posteriormente las células serán despegadas empleando tripsina, estas serán lavadas con medio incompleto y se procederá a centrifugarlas a 1000rpm por 5min, la formación del pellet, permitirá realizar la extracción de ARN, empleando el método de TRIZOL – Cloroformo.

EL ARN extraído será cuantificado empleando la técnica de Fluorometría, así como su calidad y su integridad serán medidas por Espectrofotometría (260nm y 230nm) y Electroforesis respectivamente. Seguidamente se llevará a cabo la Síntesis de cDNA empleando el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (THERMO FISHER).

La expresión genética se realizará analizando los genes BACE1, PSEN1 y APP, empleando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real(qPCR), se emplearan Cebadores específicos que amplifican las regiones de interés de dicho gen, se analizara la cuantificación relativa de genes, empleando un gen el referencia Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), el cual ayudara en la cuantificación de dichos genes.

7. Campo de Verificación

8.1 Ubicación Espacial:

El trabajo se desarrollará en la ciudad de Arequipa, en los laboratorios de Investigación en Biología Molecular y Farmacología Experimental (H-401) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María.

8. Bibliografía

1. Herrera, M., (2013), Tesis: Análisis de la expresión de tau, APP, nicastrina, betasecretasa y genes asociados, en leucocitos, como marcadores de la enfermedad de Alzheimer.
2. Gonzales, D., (2013), Tesis: Revisión sobre las Bases Moleculares de la Enfermedad de Alzheimer.
3. Munoz, T., (2010) Tesis: Aproximación in vitro a la patogénesis de la enfermedad de alzheimer familiar.
4. Manzano. S., et. al (2009). Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer
5. Yun Lei. et al., Involvement of Intracellular and Mitochondrial A β in the Ameliorative Effects of Huperzine A against Oligomeric A β 42- Induced Injury in Primary Rat Neurons

6. BIN L. AND HONG J. (2002) Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 304 (1)
7. BULTEAU, A. L., IKEDA-SAITO, M. AND SZWEDA, L. I. (2003) Redox dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* 42: 14846–14855.
8. CHANG I. (2007) Citotoxicidad, producción de anión Superóxido y fragmentación del DNA por efecto de la azodicarbonamida (ABA) en macrófagos murinos. *Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas – UCSM*
9. CHEUNG S., et al., : (2006) Regulation of phosphoinositide 3-kinase signaling by oxidants: Hydrogen peroxide selectively enhances immunoreceptor-induced recruitment of phosphatidylinositol (3,4) biphosphatebinding PH domain proteins. *Cellular Signalling* 19: 902–912.
10. CHOI J., et al., . (2007) Zaprinast inhibits hydrogen peroxide-induced lysosomal destabilization and cell death in astrocytes. *European Journal of Pharmacology*.
11. CICCONE CD. (1998) Free-Radical Toxicity and Antioxidant Medications in Parkinson's Disease. *Phys Ther.* 78:313-319. 82
12. CONFORTI L., ADALBERT R., AND COLEMAN M. P. (2006) Neuronal death. Where does the end begin? *Neurosciences* 30 (4): 159-166. DAVIS J.M. (2005) *Basic Cell Culture - Second edition – Research & Development Department, Bio Products Laboratory - Oxford University, Oxford New York.*
13. DESMARCHEILER C. AND CICCIA G. (1998) Antioxidantes de origen vegetal. *Cátedra de Microbiología industrial y Biotecnología. Facultad de farmacia y bioquímica – Universidad de Buenos Aires – Hoy – Nº 44.*
14. GIORGIO M., TRINE M., MIGLIACCIO E. AND PELICCI P. G. (2007) Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature reviews | molecular cell biology* 8: 722-728.
15. GONZÁLES-TORRES L. Y ARMENDÁRIZ-BORUNDA J. (2005) Aspectos inmunológicos en la enfermedad de Parkinson. *Neuroscience (Mex)* 10 (3): 168-169.
16. ISHIMURA A., SHIGE K., TAIRA T., SHIMBA S., ONO S., ARIGA H., TEZUKA M: AND ITO Y., (2007) Comparative study of hydrogen peroxide- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced cell death in HT22 cells. *Neurochemistry International* 52: 776-785.
17. TROTTI D., ROSSI D., GJESDAL O., LEVY L. M., RACAGNI G., DANBOLT N. C., AND VOLTERRA A. (1995) Peroxynitrite Inhibits Glutamate, Transporter Subtypes. *The Journal of Biological Chemistry.* 271 (11): 5976-5979.

ANEXO 2

METODOLOGIA PARA EL DESPEGUE DE CELULAS DE NEUROBLASTOMA SH-SY5Y

1. Luego de 48 a 72 horas de acondicionadas las células SH-SY5Y, estas se evalúan al microscopio para identificar su porcentaje de confluencia y diferenciación, así como también posibles contaminaciones.
2. Luego se esteriliza la cabina de bioseguridad con luz UV por 15min, luego se enciende la cabina para que el flujo sea continuo y se cree una atmosfera libre de contaminantes.
3. A los contenedores de células (flasck) se retira el medio de cultivo empleando una pipeta estéril.
4. Se añade 3ml de Tripsina y se deja incubando por 5 a 37°C.
5. Luego se mezcla la solución en el flasck y se agrega 1ml de Suero fetal bovino para inactivar la tripsina.
6. Se pasa la solución a tubos falcon de 15ml y se procede a centrifugar por 5min a 1000rpm.
7. Se desecha el sobrenadante, el pellet formado correspondiente a las células se mezcla con 1ml de medio completo DMEM.
8. Luego se traspara las células a tubos eppendorf estériles para continuar con los ensayos pertinentes.

ANEXO 3

METODOLOGIA PARA LA EXTRACCION DE ARN TOTAL A PARTIR DE CELULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO

1. Células despegadas de flasck de cultivo celular fueron centrifugadas por 5min a 2000rpm en una centrifuga refrigerada a 8°C.
2. Eliminar el sobrenadante y al pellet formado, añadir 600ul de TRIZOL, resuspender la solución hasta eliminar el pellet.
3. Dejar en incubación por 10min a temperatura ambiente
4. Luego añadir 200ul de agua molecular libre de RNasas, centrifugar por 15 min a 12000rpm las muestras.
5. Tomar 400Uul del sobrenadante y traspasarlo a un tubo eppendorf limpio.
6. Añadir 350ml de Isopropanol frio y dejar incubando a -20°C por 10min.
7. Luego centrifugar por 10min a 12000rpm
8. Eliminar el sobrenadante y lavar con 500ul de etanol al 70% por 2 veces.
9. Eliminar el etanol de los tubos, dejar que se evaporen volúmenes pequeños de etanol dejando abierto el tubo.
10. Añadir 40ul de agua libre de nucleasas y RNasas.
11. Dar vortex a los tubos por 15min.

ANEXO 4

PROTOCOLO DE DESCONGELAMIENTO DE CELULAS SH-SY5Y

1. Se extrae 2 o 3 crioviales de la congeladora de nitrógeno líquido (-180°C).
2. Los crioviales son colocados en baño maría a 37°C por 5 min.

El procedimiento se lleva a cabo en la cabina de bioseguridad

3. Se pasa el medio y células por completo del criovial hacia un flasck de 5ml.
4. Luego se añade 5ml de medio de cultivo DMEM completo al flasck
5. Se lleva el flasck a 37°C , por 48 horas, luego estarán listos para iniciar ensayos.



ANEXO 5

TRATAMIENTOS PREPARADOS CON 03 ECOTIPOS DE MACA

MACA AMARILLA

Tratamiento	Componentes
T1	Blanco + DMSO
T2	Maca Ama(0.5ug/mL) + B-A 24h
T3	Maca Ama(10ug/mL) + B-A 24h
T4	DMSO + B-A 24h
T5	Maca Ama(0.5ug/mL) + B-A 48h
T6	Maca Ama(10ug/mL) + B-A 48h
T7	DMSO + B-A 48h

MACA NEGRA

Tratamiento	Componentes
T1	Blanco + DMSO
T2	Maca Neg(0.5ug/mL) + B-A 24h
T3	Maca Neg(10ug/mL) + B-A 24h
T4	DMSO + B-A 24h
T5	Maca Neg(0.5ug/mL)48h + Maca Neg(0.5ug/mL)48h +B-A
T6	Maca Neg(10ug/mL) + Maca Neg(10ug/mL)+B-A
T7	DMSO + B-A 48h

MACA ROJA

Tratamiento	Componentes
T1	Blanco + DMSO
T2	Maca Roj(0.5ug/mL) + B-A 24h
T3	Maca Roj(10ug/mL) + B-A 24h
T4	DMSO + B-A 24h
T5	Maca Roj(0.5ug/mL)48h + Maca Roj(0.5ug/mL)48h +B-A
T6	Maca Roj(10ug/mL) + Maca Roj(10ug/mL)+B-A
T7	DMSO + B-A 48h

ANEXO 6

TRATAMIENTOS PREPARADOS N – benziloctadecanamida (M75),

N – benziloctadecanamida (M75),

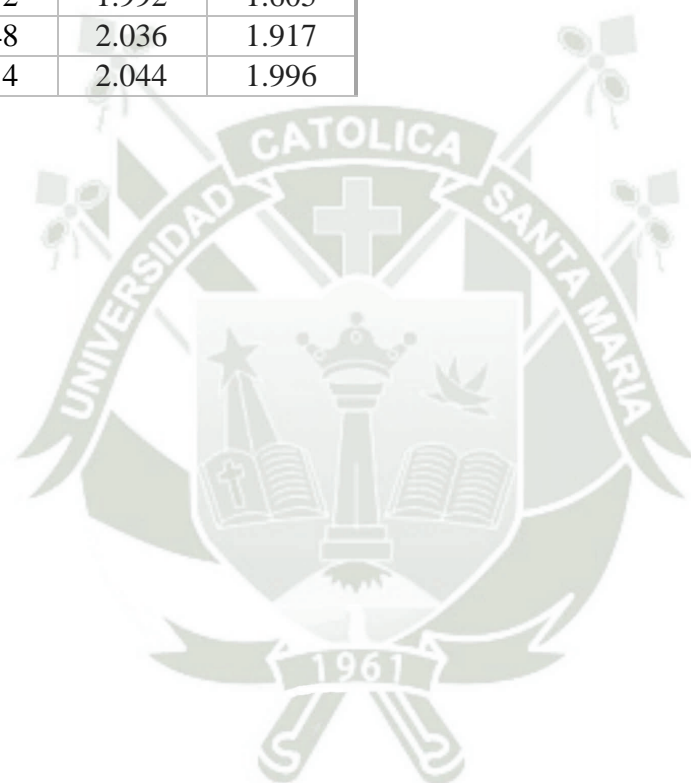
Tratamiento	Componentes
T1	Blanco + DMSO
T2	M75(0.5ug/mL) + B-A 24h
T3	M75(10ug/mL) + B-A 24h
T4	DMSO + B-A 24h
T5	M75(0.5ug/mL) + M75(0.5ug/mL) + B-A 48h
T6	M75(10ug/mL) + M75(10ug/mL) +B-A 48h
T7	DMSO + B-A 48h

ANEXO 7

Lecturas de absorbancia del ARN a 230nm, 260nm y 280nm y relación de pureza (260/280 y 260/230).

Muestra	Abs 230nm	Abs 260nm	Abs 280nm	260/280	260/230	Muestra	Abs 230nm	Abs 260nm	Abs 280nm	260/280	260/230
M1	0.498	0.847	0.425	1.993	1.700	M21	0.867	1.539	0.779	1.975	1.775
M2	1.244	2.017	0.977	2.065	1.621	M22	0.563	0.858	0.395	2.174	1.524
M3	0.667	1.324	0.610	2.171	1.984	M23	1.020	1.662	0.831	2.000	1.630
M4	0.947	1.796	0.852	2.109	1.896	M24	0.365	0.649	0.304	2.132	1.777
M5	0.458	0.793	0.384	2.066	1.730	M25	0.698	1.092	0.523	2.089	1.565
M6	0.441	0.713	0.353	2.017	1.615	M26	1.078	1.804	0.828	2.179	1.673
M7	0.814	1.407	0.654	2.152	1.729	M27	0.361	0.764	0.391	1.954	2.114
M8	0.451	0.785	0.387	2.027	1.739	M28	0.893	1.536	0.735	2.091	1.720
M9	0.917	1.726	0.791	2.182	1.882	M29	0.888	1.824	0.887	2.056	2.053
M10	0.552	0.985	0.482	2.043	1.785	M30	0.739	1.161	0.582	1.996	1.570
M11	0.520	0.914	0.464	1.969	1.757	M31	1.195	2.542	1.249	2.035	2.127
M12	1.461	2.593	1.337	1.940	1.775	M32	1.165	2.435	1.246	1.955	2.091
M13	0.920	1.636	0.745	2.197	1.778	M33	0.710	1.146	0.529	2.165	1.614
M14	1.679	2.593	1.206	2.150	1.544	M34	1.063	1.850	0.941	1.965	1.741
M15	1.127	2.243	1.147	1.956	1.991	M35	1.593	2.472	1.176	2.102	1.552
M16	0.435	0.854	0.427	2.001	1.961	M36	0.867	1.584	0.769	2.059	1.826
M17	0.579	0.876	0.420	2.087	1.513	M37	0.400	0.838	0.423	1.981	2.097
M18	0.617	1.101	0.506	2.176	1.785	M38	0.338	0.546	0.267	2.046	1.614
M19	0.883	1.601	0.745	2.149	1.814	M39	1.257	2.183	1.061	2.058	1.737
M20	1.271	2.441	1.172	2.082	1.921	M40	0.765	1.442	0.693	2.081	1.886
M41	0.555	1.053	0.529	1.990	1.896						
M42	1.171	1.900	0.893	2.127	1.623						
M43	1.804	2.951	1.462	2.018	1.636						

M44	1.257	2.427	1.122	2.163	1.931
M45	0.803	1.658	0.847	1.957	2.064
M46	0.842	1.643	0.846	1.941	1.952
M47	0.387	0.621	0.312	1.992	1.605
M48	0.689	1.320	0.648	2.036	1.917
M49	0.424	0.846	0.414	2.044	1.996



ANEXO 8

CONCENTRACIONES DE ARN MEDIDAS POR FLUOROMETRÍA.

Muestra	Concentración ARN (ng/μL)	Muestra	Concentración ARN (ng/μL)
M1	40.67	M36	59.00
M2	10.87	M37	59.00
M3	43.33	M38	58.00
M4	77.00	M39	46.20
M5	45.33	M40	51.00
M6	48.67	M41	61.00
M7	46.67	M42	18.00
M8	54.67	M43	60.00
M9	46.00	M44	56.00
M10	38.67	M45	60.00
M11	27.60	M46	43.40
M12	53.33	M47	37.20
M13	60.00	M48	46.40
M14	56.67	M49	60.00
M15	45.67		
M16	66.67		
M17	54.00		
M18	44.67		
M19	17..67		
M20	62.00		
M21	66.67		
M22	25.67		
M23	23.07		
M24	54.00		
M25	42.00		
M26	28.87		
M27	29.67		
M28	33.33		
M29	50.67		
M30	46.00		
M31	79.87		
M32	28.20		
M33	46.00		
M34	58.00		

ANEXO 9

CONCENTRACIONES DE ADNc MEDIDAS POR FLUOROMETRÍA.

Muestra	Concentración ADNc (ng/μL)	Muestra	Concentración ADNc (ng/μL)
M1	3.17	M25	2.54
M2	2.14	M26	8.25
M3	2.31	M27	3.67
M4	2.08	M28	5.88
M5	2.25	M29	3.40
M6	2.84	M30	2.33
M7	5.99	M31	4.53
M8	2.64	M32	2.64
M9	2.25	M33	3.97
M10	5.93	M34	7.00
M11	2.22	M35	8.18
M12	4.98	M36	7.02
M13	1.16	M37	4.06
M14	3.84	M38	2.69
M15	6.35	M39	6.17
M16	5.57	M40	9.20
M17	2.29	M41	3.03
M18	2.80	M42	5.28
M19	2.46	M43	4.36
M20	7.82	M44	4.51
M21	3.71	M45	5.37
M22	4.71	M46	6.77
M23	7.98	M47	6.28
M24	3.07	M48	4.51
		M49	5.82

ANEXO 10

EXPRESION GENETICA

1. Expresion de BACE1, APP PSEN1

	B amiloide	EXPRESION GENETICA
BACE1	0.1uM	24.76+/-2.78 ^c
	0.5uM	42.22+/-2.17 ^b
	1uM	74.03+/-2.63 ^d
	5uM	9.71+/-0.11 ^a
	10uM	238.86+/-8.41 ^e
APP	0.1uM	6.45+/-1.94 ^a
	0.5uM	7.45+/-1.61 ^a
	1uM	10.87+/-1.17 ^b
	5uM	12.22+/-1.89 ^{bc}
	10uM	13.98+/-4.23 ^c
PSEN1	0.1uM	16.35+/-16.81 ^a
	0.5uM	6.75+/-0.51 ^a
	1uM	11.58+/-0.8 ^a
	5uM	13.85+/-0.64 ^a
	10uM	20.44+/-22.07 ^a

2. EXPRESION DE BACE1, EXPONIENDO CELULAS SH-SY5Y A ECOTIPOS DE MACA.

		Expresión
Maca Roja	0.5 ug/mL	0.34+/-0.04 ^b
	1 ug/mL	0.45+/-0.15 ^c
	10ug/mL	0.01+/-0.00 ^a
	25 ug/mL	0.32+/-0.19 ^b
	50ug/mL	0.44+/-0.06 ^c
Maca Amarilla	0.5 ug/mL	3.86+/-1.41 ^b
	1 ug/mL	0.86+/-0.78 ^a
	10ug/mL	0.47+/-0.25 ^a
	25 ug/mL	0.78+/-0.06 ^a
	50ug/mL	0.66+/-0.21 ^a
Maca Negra	0.5 ug/mL	0.92+/-0.50 ^a
	1 ug/mL	4.09+/-2.10 ^b
	10ug/mL	0.61+/-0.58 ^a
	25 ug/mL	0.33+/-0.19 ^a

3. XPRESION DE APP, EXPONIENDO CELULAS SH-SY5Y A ECOTIPOS DE MACA.

		Expresión
Maca Roja	0.5 ug/mL	58.49+/-20.46 ^{ab}
	1 ug/mL	48.84+/-12.37 ^a
	10ug/mL	64.45+/-6.79 ^b
	25 ug/mL	55.72+/-7.89 ^{ab}
	50ug/mL	86.22+/-26.79 ^c
Maca Amarilla	0.5 ug/mL	4.44+/-1.49 ^c
	1 ug/mL	5.17+/-4.07 ^c

	10ug/mL	1.71+/-0.41 ^a
	25 ug/mL	6.75+/-0.69 ^d
	50ug/mL	2.38+/-0.43 ^b
Maca Negra	0.5 ug/mL	2.41+/-1.16 ^c
	1 ug/mL	1.82+/-1.25 ^{ab}
	10ug/mL	1.97+/-0.48 ^{ab}
	25 ug/mL	1.38+/-0.11 ^a
	50ug/mL	1.58+/-0.84 ^a
4. EXPRESION DE APP, EXPONIENDO CELULAS SH-SY5Y A ECOTIPOS DE MACA.		
		Expresión
Maca Roja	0.5 ug/mL	7.2+/-12.85 ^c
	1 ug/mL	17.16+/-0.85 ^d
	10ug/mL	2.64+/-2.96 ^{ab}
	25 ug/mL	2.75+/-5.22 ^{ab}
	50ug/mL	2.03+/-2.54 ^a
Maca Amarilla	0.5 ug/mL	0.39+/-0.07 ^a
	1 ug/mL	4.96+/-5.01 ^b
	10ug/mL	0.92+/-0.4 ^a
	25 ug/mL	0.5+/-0.63 ^a
	50ug/mL	0.07+/-0.05 ^a
Maca Negra	0.5 ug/mL	0.04+/-0.01 ^{ab}
	1 ug/mL	0.08+/-0.02 ^c
	10ug/mL	0.22+/-0.07 ^d
	25 ug/mL	0.01+/-0.02 ^a
	50ug/mL	0.07+/-0.11 ^c

5. EXPRESIÓN DEL GEN BACE1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A
DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO Y SUSTANCIA

		Expresión
Maca Roja	Blanco + DMSO	0.3+/-0.09 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.94+/-1.12 ^a
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	2.87+/-0.25 ^b
	DMSO + B-A 24h	1.12+/-0.32 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	4.24+/-0.11 ^c
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	3.62+/-1.83 ^{bc}
	Cel + DMSO + B-A 48h	5.50+/-3.9 ^d
Maca Amarilla	Blanco + DMSO	3.71+/-1.65 ^c
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	1.64+/-1.23 ^a
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	2.81+/-1.77 ^{ab}
	DMSO + B-A 24h	3.53+/-5.89 ^c
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	2.34+/-2.03 ^{ab}
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	3.02+/-1.38 ^{ab}
	Cel + DMSO + B-A 48h	1.48+/-1.03 ^a
Maca Negra	Blanco + DMSO	0.56+/-0.57 ^{bc}
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.77+/-0.66 ^c
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	0.38+/-0.41 ^{ab}
	DMSO + B-A 24h	0.19+/-0.24 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.18+/-0.06 ^a
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	0.23+/-0.17 ^a
M75	Blanco + DMSO	0.15+/-0.08 ^a

Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.01+/-0.00 ^a
Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	0.39+/-0.32 ^{ab}
DMSO + B-A 24h	11.07+/-3.78 ^c
Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.26+/-0.19 ^{ab}
Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	0.28+/-0.27 ^{ab}
Cel + DMSO + B-A 48h	1.24+/-0.38 ^b

6. EXPRESIÓN DEL GEN BACE1 EN CÉLULAS SH-SY5Y EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO Y SUSTANCIA

	Expresión	
	Blanco + DMSO	0.3+/-0.09 ^a
Maca Roja	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.94+/-1.12 ^a
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	2.87+/-0.25 ^b
	DMSO + B-A 24h	1.12+/-0.32 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	4.24+/-0.11 ^c
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	3.62+/-1.83 ^{bc}
	Cel + DMSO + B-A 48h	5.50+/-3.90 ^d
		Blanco + DMSO
Maca Amarilla	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	1.64+/-1.23 ^a
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	2.81+/-1.77 ^{ab}
	DMSO + B-A 24h	3.53+/-5.89 ^b
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	2.34+/-2.03 ^{ab}
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	3.02+/-1.38 ^{ab}
	Cel + DMSO + B-A 48h	1.48+/-1.03 ^a
	Blanco + DMSO	0.56+/-0.57 ^{bc}
Maca Negra	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.77+/-0.66 ^c

	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	0.38+/-0.41 ^{ab}
	DMSO + B-A 24h	0.19+/-0.24 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.18+/-0.06 ^a
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	0.23+/-0.17 ^a
	Cel + DMSO + B-A 48h	0.13+/-0.08 ^a
	Blanco + DMSO	0.15+/-0.08 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.01+/-0.00 ^a
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	0.39+/-0.32 ^{ab}
M75	DMSO + B-A 24h	11.07+/-3.78 ^c
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.26+/-0.19 ^{ab}
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	0.28+/-0.27 ^{ab}
	Cel + DMSO + B-A 48h	1.24+/-0.38 ^b

7. EXPRESIÓN DEL GEN APP EN CÉLULA SH-SY5Y EXPUESTAS A DISTINTOS TIPOS DE TRATAMIENTO Y SUSTANCIA

		Expresión
	Blanco + DMSO	42.89+/-16.48 ^c
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	4.21+/-1.31 ^{ab}
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	3.32+/-2.10 ^a
Maca Roja	DMSO + B-A 24h	2.69+/-1.16 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	4.26+/-3.09 ^{ab}
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	8.88+/-3.62 ^b
	Cel + DMSO + B-A 48h	7.28+/-3.03 ^{ab}
Maca Amarilla	Blanco + DMSO	1.19+/-0.3 ^{ab}

	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	2.8+/-1.22 ^{bc}
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	4.46+/-1.79 ^c
	DMSO + B-A 24h	0.29+/-0.46 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.49+/-0.33 ^a
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	7.15+/-6.2 ^d
	Cel + DMSO + B-A 48h	8.13+/-4.15 ^d
	Blanco + DMSO	0.72+/-0.26 ^b
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.11+/-0.02 ^a
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	0.62+/-0.01 ^b
Maca Negra	DMSO + B-A 24h	1.13+/-0.3 ^c
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.47+/-0.41 ^b
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	1.31+/-0.01 ^c
	Cel + DMSO + B-A 48h	3.95+/-1.12 ^d
	Blanco + DMSO	0.25+/-0.22 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml)+ B-A 24h	0.49+/-0.43 ^{ab}
	Cel +Sust(10ug/mL) + B-A 24h	2.84+/-1.13 ^d
M75	DMSO + B-A 24h	0.24+/-0.01 ^a
	Cel + Sust (0.5ug/ml) + Sust (0.5ug/ml) + B-A 48h	0.75+/-0.10 ^b
	Cel +Sust (10ug/mL) + Sust (10ug/ml)+B-A 48h	1.24+/-0.27 ^c
	Cel + DMSO + B-A 48h	2.61+/-0.95 ^d