

EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA HUMANO SH-SY5Y EXPUESTAS A EXTRACTOS PENTÁNICOS DE *Lepidium Meyenii* L.

EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS IN CELLS OF HUMAN NEUROBLASTOMA SH-SY5Y EXPOSED TO PENTANIC EXTRACTS FROM *Lepidium Meyenii* L.

Mocita De la Fuente Torres,² Julitza Paredes Fuentes,^{1,2} José Carpio Carpio,² Karin Vera Lopez,² Benjamín Paz Aliaga,² José Villanueva Salas.^{1,2}

(1) Laboratorio de Investigación del Proyecto Mercurio,
(2) Laboratorio de Biología Molecular y Farmacología Experimental,
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas,
Universidad Católica de Santa María – Arequipa

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

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de extractos pentánicos de *Lepidium meyenii* L (Maca) sobre la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuestas al péptido β amiloide, agente causante de las placas seniles presentes en los cerebros de personas que padecen la enfermedad de Alzheimer. Se utilizaron células de neuroblastoma humano SH-SY5Y que fueron expuestas a diferentes concentraciones del péptido β amiloide durante 1 hora. Las células también fueron expuestas a distintas concentraciones de los extractos pentánicos de cada maca para después evaluar la producción de especies reactivas de oxígeno mediante el método de oxidación del dihydroethidium por acción del anión superóxido. Por último las células fueron pretratadas con los extractos pentánicos de cada maca durante 24 horas, para posteriormente inducir la producción de especies reactivas de oxígeno con la aplicación del péptido β amiloide.

Como resultado se observó que el péptido β amiloide a una concentración de 1 μ M fue el que generó una mayor producción de (EROs). Los extractos pentánicos de las distintas variedades de maca en concentraciones menores a 25 ppm produjeron una disminución significativa del porcentaje de especies reactivas de oxígeno luego de 24 horas de exposición. Los extractos pentánicos de la maca negra y amarilla demostraron tener mejor efecto protector a una concentración de 0.5 ppm en comparación con la maca roja, después de la exposición de las células al péptido β amiloide a una concentración de 1 μ M, debido a que el porcentaje de (EROs) disminuyó de manera significativa (P 0.05).

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

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

The objective of this study was to evaluate the effect of *Lepidium meyenii* L (Maca) penthane extracts on the production of reactive oxygen species (ROS) in human neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to amyloid β peptide, the causative agent of senile plaques present in the brains of people suffering from Alzheimer's disease. SH-SY5Y human neuroblastoma cells that were exposed to different concentrations of amyloid β peptide were used for 1 hour. The cells were also exposed to different concentrations of the pentane extracts of each maca to later evaluate the production of reactive oxygen species by means of the oxidation method of the dihydroethidium by superoxide anion. Finally, the cells were pretreated with the pentane extracts of each Maca for 24 hours, to subsequently induce the production of reactive oxygen species with the application of β -amyloid peptide.

As a result, it was observed that the β amyloid peptide that generated the highest production of (EROs) was at a concentration of 1 μ M. The pentane extracts of the different varieties of maca at concentrations below 25 ppm produced a significant decrease in the percentage of reactive oxygen species in 24 hours of exposure alone.

The pentane extracts of black and yellow maca were shown to have a better protective effect at a concentration of 0.5 ppm compared to red maca, after exposure of the cells to amyloid β peptide at a concentration of 1 μ M, because the percentage of (EROs) decreased significantly (P = 0.05).

Keywords: Alzheimer, Maca, β amyloid peptide, Reactive oxygen species

INTRODUCCIÓN

Lepidium meyenii L. conocida en América del Sur como "Maca", es un cultivo andino, que se encuentra solo en un área muy restringida del centro del Perú, en la zona agroecológica entre 4000 y 4500. Presenta tres ecotipos,

reconocibles por el color característico externo de los hipocotilos o raíces como son: la Maca Negra, Maca Amarilla y Maca Roja.(1)(2).

Varios estudios realizados a esta planta han mostraron que los diferentes colores de la maca producen diferentes respuestas biológicas.

La maca roja por ejemplo revierte la hiperplasia benigna prostática inducida por testosterona (3) y la osteoporosis inducida por ovariectomía en ratas adultas (4), mientras que la maca negra induce al aumento de espermatozoides

Correspondencia:

Jose A. Villanueva Salas

E-mail: jvillans@ucsm.edu.pe

y reduce los niveles de azúcar en la sangre (5), además de mejorar la memoria y aprendizaje (6)

La Enfermedad de Alzheimer (EA) se caracteriza por un deterioro progresivo de las funciones cognitivas conductuales y funcionales que afectan la capacidad y el desenvolvimiento en la vida (7),(8).

La atrofia es el resultado de la degeneración de las sinapsis y la muerte de las neuronas, en particular en el hipocampo (9), la región del cerebro que juega un papel muy importante en la memoria y la orientación espacial. La edad es el factor de riesgo más alto para la EA, el riesgo de desarrollar la enfermedad alcanza el 50% para las personas mayores de 85 años (10).

Una de las causas que origina esta enfermedad es la presencia de placas amiloides llamadas "placas seniles" encontradas en el espacio extracelular del cerebro de una persona enferma y están particularmente presentes en la región del hipocampo. Estas placas se componen principalmente de un péptido llamado β amiloide (A β) (8)(11).

El estrés oxidativo es un estado originado por la oxidación de biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos por especies reactivas de oxígeno (EROs) como : el anión superóxido y el radical hidroxilo, la característica que comparten las EROs es que presentan electrones desapareados que son donados a éstas biomoléculas alterando su funcionalidad. EL estrés oxidativo ocurre en fases tempranas de EA, lo que apoyaría su papel en la patogénesis de la EA, en relación con la presencia de A β . De hecho, se ha informado que niveles elevados de péptido β amiloide se asocian con mayores niveles de producción de oxidación a partir de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en el hipocampo y la corteza. (12). El presente trabajo tiene como finalidad evaluar si los extractos pentánicos de *Lepidium meyenii* pueden disminuir los porcentajes de especies reactivas de oxígeno en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y expuesta al péptido β amiloide ya mencionado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- **Neuroblastoma SH-SY5Y**
Se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y (ATCC®), que fue cultivada en medio DMEN con 10 % de suero fetal bovino a 37° C en una atmosfera de 5% de CO₂
- **Extracto Péntanico de *Lepidium meyenii* L (Maca).**
Se utilizaron los extractos pentánicos de las tres variedades de *Lepidium meyenii* L. (maca) como son la negra, amarilla y roja. Se utilizó el método de extracción por Soxhlet, con metanol, para luego realizar una reextracción líquido-líquido con pentano, el extracto pentánico fue almacenado a -20°C hasta su utilización.

Métodos

1. Ensayos para determinar especies reactivas de oxígeno (EROS)

Método general para determinar especies reactivas de oxígeno (EROS)

Se utilizó el kit de estrés oxidativo Muse® para la determinación de especies reactivas de oxígeno, el

reactivo de identificación tiene el compuesto Dihydroethidium (DHE), compuesto no fluorescente que puede atravesar la membrana de células. En el interior se oxida por el anión superóxido produciendo etidium, compuesto que se intercala en el DNA emitiendo fluorescencia.

2. Determinación de las especies reactivas de oxígeno en células expuestas a las distintas variedades de *Lepidium meyenii* L. (Maca) y al péptido β amiloide solos

Se prepararon 5 soluciones de los extractos pentánicos de cada maca, cuyas concentraciones fueron de 0.5 ; 1; 10; 25 y 50 ppm por pozo, el vehículo utilizado para la dilución fue DMSO 0.5 %, estas soluciones fueron aplicadas a cada pozo de la placa de 96.

El péptido se preparó a partir de una solución stock al 1000 uM, que se preparó pesando 1 mg que se diluyó con DMSO como vehículo para obtener un volumen final de 1 mL. De la solución stock se tomó 40 uL y se diluyó con 3,96 mL de medio para obtener una concentración de 10 uM, a partir de esta solución se tomaron diferentes volúmenes para obtener concentraciones de 0.1; 0.5; 1; 5; y 10 uM del péptido por pozo.

Para realizar ambos ensayos se consideró una concentración de 30000 células / pozo, éstas se lograron obtener a partir del número aproximado de células del conteo celular. EL primer día del ensayo las células fueron tratadas con medio completo (suero fetal bovino al 10 %) , luego fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el segundo día se retiró el medio completo y se adicionó medio incompleto (suero fetal bovino al 5%), y fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el tercer día se aplicó el tratamiento con los extractos de la maca a un grupos y el péptido β amiloide al otro grupo.

3. Determinación de las especies reactivas de oxígeno en células expuestas a las tres variedades de *Lepidium meyenii* L. (Maca) y al péptido β amiloide

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

EL primer día del ensayo la células fueron tratadas con medio completo (suero fetal bovino 10%), luego fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas , el segundo día se retiró el medio completo y se adicionó medio incompleto (suero fetal bovino 5 %), y fueron incubadas a 37°C y 5 % de CO₂ por 24 horas, el tercer día se aplicaron los siguientes tratamientos en las concentraciones de 0,5 ; 10 y 50 ppm para los extractos pentánicos de 0.05; 0 además se trabajó con un grupo control que contenía solo medio, un grupo control con DMSO, y el grupo Control con DMSO al que se le adicionará el péptido β amiloide después de 24 horas al igual que a los pozos que contienen los extractos, el estrés oxidativo se evaluó después de una hora de exposición.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Evaluación de las especies reactivas de oxígeno a distintas concentraciones de la maca

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y fueron expuestas a 5 concentraciones distintas del

extracto pentánico para cada maca, el porcentaje de EROs generado en las células fue medido después de 24 horas de exposición al extracto.

En la tabla N°1 se muestra los promedios del porcentaje de EROS de los grupos control y de los grupos correspondientes a cada concentración de maca, se observa que las concentraciones menores a 25 ppm no producen un aumento considerable de EROs en relación a los controles.

Tabla 1. Porcentaje de especies reactivas de oxígeno a 24 horas de exposición de la las distintas variedades de maca

Grupos	Porcentaje de Especies Reactivas de Oxígeno		
	Maca Negra	Maca Roja	Maca Amarilla
Control	2.7	2.6	2.2
0.5 ppm	1.8	1.2	1.9
1 ppm	1.7	2	2.2
10 ppm	1.8	2.8	2.8
25 ppm	1.8	2.5	2.7
50 ppm	2.5	4.5	4.7

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

En la Tabla N°2 se observa que la maca roja y la maca amarilla, presentaron diferencias significativas en cuanto a la producción de EROs a distintas concentraciones. Los valores de EROs en la maca negra no mostraron una diferencia significativa con respecto al control, razón por la cual se puede decir que la exposición a este tipo de maca a concentraciones menores de 50 ppm del extracto administrado, presentan un mejor efecto protector frente a la producción de EROs cuando se aplica sola por un tiempo de exposición de 24 horas a un nivel de significancia de 0.05.

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

Tabla 2. Anova para la evaluación de las concentraciones dentro de un mismo grupo

Grupos experimentales	N	Media	Desviación estándar	F	Sig.	
Maca Negra	Control	3	2.74	0.47	2.68	0.08
	0.5 ppm	3	1.83	0.34		
	1 ppm	3	1.74	0.43		
	10 ppm	3	1.84	0.7		
	25 ppm	3	1.83	0.43		
	50 ppm	3	2.5	0.16		
Maca Roja	Control	3	3.6	0.06	7.37	0
	0.5 ppm	3	1.16	0.27		
	1 ppm	3	2	0.94		
	10 ppm	3	2.84	0.5		
	25 ppm	3	2.3	0.62		
	50 ppm	3	3.8	0.93		
Maca Amarilla	Control	3	2.2	0.94	13.7	0
	0.5 ppm	3	1.87	0.47		
	1 ppm	3	2.17	0.32		
	10 ppm	3	2.83	0.03		
	25 ppm	3	2.66	0.2		
	50 ppm	3	4.7	0.36		

2. Determinación de las especies reactivas de oxígeno producido por el péptido β amiloide.

Los datos mostrados en la tabla N°3 muestran el promedio del porcentaje de EROs generado cuando las células fueron expuestas al péptido β amiloide a diferentes concentraciones, además se observa que existe una diferencia significativa entre todos los grupos. EL porcentaje de EROs más alto se generó cuando las células estuvieron expuestas a una concentración de 1 uM Se sabe el péptido β amiloide puede producir un incremento de la viabilidad en células expuestas a concentraciones mayores a 5 uM como mecanismo de protección contra agentes exógenos, por esta razón puede explicarse la disminución del porcentaje de EROs en células que tienen mayores concentraciones del péptido (13) (14).

3. Evaluación de las especies reactivas de oxígenos en celulas pretratadas con extracto de péptido β amiloide

EL objetivo principal de este trabajo fue investigar si los extractos pentánicos de los ecotipos de macas presentes en el país, pueden influir en la disminución de las especies reactivas de oxígeno en células que fueron expuestas al péptido β amiloide como se mencionó anteriormente, esta molécula es el agente responsable de la alteración en la sinapsis nerviosa y como consecuencia la disminución de la memoria

Tabla 3. Evaluación del porcentaje de eros en celulas expuestas a distintas concentraciones del péptido β amiloide

GRUPOS EXPERIMENTALES	N	Media	Desviación estándar	F	Sig.
Control	3	2.78	0.21	74.29	0.000
0.1 uM	3	4.97	0.26		
0.5 uM	3	5.67	0.56		
1 uM	3	8.3	0.45		
5 uM	3	6.54	0.32		
10 uM	3	7.22	0.41		

Tabla 4. Porcentaje de especies reactivas de oxígeno en células de neuroblastoma pre tratadas con diferentes macas

Grupos Experimentales		N	Media	Desviación estándar	F	Sig.
Maca Negra	Control	3	2.07	0.25	76.99	0.000
	Control DMSO	3	5.9	0.39		
	Control DMSO péptido β amiloide	3	8.67	0.34		
	0.5 ppm	3	4.9	0.5		
	10 ppm	3	7.87	0.73		
	50 ppm	3	8.4	0.64		
Maca Roja	Control	3	1.78	0.22	58.13	0.000
	Control DMSO	3	5.83	0.46		
	Control DMSO péptido β amiloide	3	9.08	0.72		
	0.5 ppm	3	7.66	0.53		
	10 ppm	3	9.65	0.94		
	50 ppm	3	10.17	1.07		
Maca Amari	Control	3	2	0.19	129.2	0.000
	Control DMSO	3	5.63	0.34		
	Control DMSO péptido β amiloide	3	9.56	0.62		
	0.5 ppm	3	7.57	0.39		
	10 ppm	3	9.08	0.23		
	50 ppm	3	10.54	0.8		

En la Tabla N° 4 se observa que existe una diferencia significativa entre los grupos de cada variedad de maca a un nivel de significancia de 0.05. Los porcentajes de EROs en células expuestas al DMSO únicamente, fueron elevados siendo esta diferencia significativa en comparación con el control, se sabe que este agente químico puede provocar toxicidad en concentraciones elevadas, pero en los datos de la tabla N° 2 se evidencia que la maca aplicada sola puede contrarrestar los efectos producidos al disminuir el porcentaje de EROs a las 24 horas.

Al realizar el análisis de comparaciones múltiples entre grupos de cada maca se observa que la maca negra y amarilla en las concentraciones de 0.5 ppm redujeron de manera significativa el porcentaje de EROs comparado con el grupo expuesto a DMSO y péptido β amiloide (DSMO BETA). Mientras que la concentración de 50 ppm no generó una disminución significativa del porcentaje de EROs en los tres tipos de maca. Si bien se observa que la maca roja produjo una disminución de los valores de EROs a concentraciones de 0.5 y 10 ppm (Tabla N° 4) esta disminución no fue significativa, en contraste con la maca amarilla y negra que si lograron una disminución significativa a una concentración a esas mismas concentraciones. Se puede considerar también que a partir de concentraciones mayores a 50 ppm el porcentaje de EROs aumenta en las tres variedades de maca.

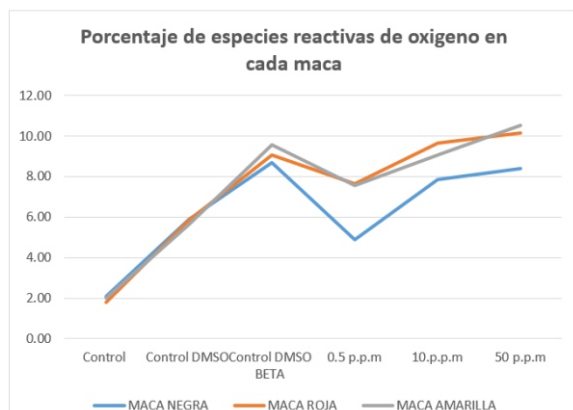


Fig. 1. Porcentaje de especies reactivas de oxígeno en cada grupo experimental

CONCLUSIONES

Los extractos pentánicos de las macas negra, roja y amarilla disminuyeron el porcentaje de especies reactivas de oxígeno de manera significativa en las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y tratadas en un periodo de 24 horas.

La concentración de péptido β amiloide que generó mayor porcentaje de especies reactivas de oxígeno cuantificadas con el método de oxidación del dihydroetidum fue de 1 uM durante 1 hora de exposición.

Los extractos pentánicos de la maca negra y amarilla presentaron un mejor efecto protector frente a la maca roja al disminuir la producción de especies reactivas de oxígeno a concentraciones menores de 0.5 ppm.

REFERENCIAS

- [1]. Lembè, D. M., Gasco, M., & Gonzales, G. F. **Synergistic effect of the hydroalcoholic extract from *Lepidium meyenii* (Brassicaceae) and *Fagara tessmannii* (Rutaceae) on male sexual organs and hormone level in rats.** *Pharmacognosy Research*, (2014). 6(1), 80–86.
- [2]. Gonzales-Arimborgo, C., Yupanqui, I., Montero, E., Alarcón-Yaquette, D. E., Zevallos-Concha, A., Caballero, L., ... Gonzales, G. F. **Acceptability, Safety, and Efficacy of Oral Administration of Extracts of Black or Red Maca (*Lepidium meyenii*) in Adult Human Subjects: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study.** *Pharmaceuticals*, (2016). 9(3), 49
- [3]. Gonzales GF, Gasco M., Malheiros-Pereira A., Gonzales-Castañeda C. **Efecto antagonista de *Lepidium meyenii* (maca roja) sobre la hiperplasia prostática en ratones adultos.** *Andrologia*. 2008; 40 : 179-185. doi: 10.1111 / j.1439-0272.2008.00834.
- [4]. Gonzales C., Cárdenas-Valencia I., Leiva-Revilla J., Anza-Ramírez C., Rubio J., Gonzales GF **Efecto de diferentes variedades de Maca (*Lepidium meyenii*) sobre la estructura ósea en ratas ovariectomizadas.** *Forsch. Komplementmed*. 2010; 17: 137-143. doi: 10.1159 / 000315214.
- [5]. Gonzales GF, Gonzales-Castañeda C., Gasco M. **Una mezcla de extractos de plantas peruanas (maca negra y yacón) mejora el conteo de espermatozoides y reduce la glucemia en ratones con diabetes inducida por estreptozotocina.** *Toxicol. Mech. Métodos*. 2013; 23 : 509-518. doi: 10.3109 / 15376516.2013.785656.
- [6]. Rubio J., Yucra S., Gasco M., Gonzales GF **Efecto de la dosis-respuesta de la maca negra (*Lepidium meyenii*) en ratones con deterioro de la memoria inducido por etanol.** *Toxicol. Mech. Métodos*. 2011; 21 : 628-634.
- [7]. MP Mattson. **Rutas hacia y lejos de la enfermedad de Alzheimer** *Nature* (2004), 430 (7000), pp. 631 – 639 .
- [8]. C. Cheignon M. Tomas D. Bonnefont Rousselot P Faller C. Hureau F. Collin. **Estress oxidativo y el péptido Beta amiloide en la enfermedad de Alzheimer** . *Redox Biología* Volumen 14, abril del 2018.
- [9]. LO Soto-Rojas , F. de la Cruz-López , MAO Torres , A. Viramontes-Pintos , M. del Carmen Cárdenas-Aguayo , MA Meraz-Ríos , C. Salinas-Lara , B. Florán-Garduño , J. Luna -Muñoz. **Neuroinflamación y alteración de la barrera hematoencefálica en la enfermedad de Alzheimer**. 2010.
- [10]. I.Zer (Ed.), **La enfermedad de Alzheimer: desafíos para el futuro** , InTech (2015)
- [11]. GG Glenner , CW Wong **La enfermedad de Alzheimer: informe inicial de la purificación y caracterización de una nueva proteína amiloide cerebrovascular** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* , 120 (3) (1984) , pp. 885 - 890

- [12]. Butterfield DA, Lauderback CM. **La peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas en el cerebro de la enfermedad de Alzheimer: causas potenciales y consecuencias que implican el estrés oxidativo de radicales libres asociados al beta-péptido amiloide.** Radic libre. Biol. Medicina. 2002; 32 (11): 1050- 1060.
- [13]. Harvey B. Ohlsson K. Maag Lan F, **Contrasting protective effects of cannabinoids against oxidative stress and amyloid- β evoked neurotoxicity in vitro.** NeuroToxicology, January 2012, 33, 1, 138-146.
- [14]. Nathaniel G. N. Milton, Amrutha Chilumuri, Eridan Rocha-Ferreira, Amanda N. Nercessian,‡ and Maria **Ashioti Kisspeptin Prevention of Amyloid- β Peptide Neurotoxicity in vitro.** ACS Chemical Neuroscience
- [15]. Gonzales C., Cárdenas-Valencia I., Leiva-Revilla J., Anza-Ramírez C., Rubio J., Gonzales GF **Efecto de diferentes variedades de Maca (*Lepidium meyenii*) sobre la estructura ósea en ratas ovariectomizadas.** Forsch. Komplementmed. 2010; 17 : 137-143. doi: 10.1159 / 000315214.
- [16]. Shimabuku Vega Naomi Fabiola **“Composición Química de *Lepidium meyenii* walp. (maca): comparando procedencias y colores del órgano de reserva”** Universidad Peruana Cayetano Heredia-2017.

Recibido el 20 de mayo del 2018 y aceptado para su publicación el 30 de junio del 2018