

EFECTO DE TROPAEOLUM TUBEROSUM O "MASHUA" (TROPAEOLACEAE) SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELACIONADA A ESPERMATOGÉNESIS EN RATÓN

EFFECT OF TROPAEOLUM TUBEROSUM "MASHUA" (TROPAEOLACEAE) ON GENE EXPRESSION RELATED TO SPERMATOGENESIS IN MOUSE

José Gonzales Daga ^{1a}, José Pino Gaviño ^{1,2b}, Rafael Alvis Dávila ^{3b}, Juan Francia Quiroz ^{3b}, Carlos Bell Cortez ^{4c}, Pilar Pino Velásquez ^{1d}, Betty Shiga Oshige ^{1,2b}

RESUMEN

Introducción: *Tropaeolum tuberosum*, conocido como mashua, es un tubérculo andino que tiene un valor tanto económico como nutritivo para las poblaciones de pocos recursos. Se cree que afecta la fertilidad masculina, porque los hombres andinos lo relacionan con impotencia y disminución de la capacidad fecundante. Estudios hechos en ratas que se alimentaron con mashua demostraron que hubo un 45% de decrecimiento de la tasa testosterona/dihidrotestosterona. El efecto de esta planta en la reproducción está relacionada a su contenido de isotiocianatos, compuestos que se unen covalentemente a las proteínas, las cuales pueden estar directa o indirectamente involucradas en el proceso espermatogénico. El propósito de esta investigación fue evaluar el efecto del extracto acuoso de la mashua sobre la espermatogénesis y la fisiología reproductiva de ratones. **Métodos:** Se evaluaron los parámetros morfofuncionales in vivo de espermios de ratones (espermatograma) y se cuantificó la expresión de: Cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase, proteína reguladora de esteroidogenesis aguda, ciclina y protamina, relacionados a la espermatogénesis. **Resultados:** A los 7, 14 y 21 días de dosificación, se vio afectado el conteo de espermatozoides, así como su motilidad progresiva (MP); por otra parte, se observó un retardo en la maduración de los mismos. En cuanto a la expresión génica, no se encontró diferencias significativas entre la expresión de los dos genes estudiados (cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase, ciclina). **Conclusión:** El efecto de la mashua no se da a nivel de la expresión de los genes involucrados en la espermatogénesis, sino a nivel de sus funciones como proteína.

Palabras clave: Espermatogénesis; Expresión Génica; Mashua; Ratón; *Tropaeolum tuberosum*; Plantas medicinales. (Fuente: DeCS- BIREME)

ABSTRACT

Introduction: *Tropaeolum tuberosum*, known as mashua is an Andean tuber that has both economic and nutritional value for low-income populations. It is believed that it affects male fertility because Andean men associate it with impotence and decreased fertilizing capacity. Studies done on rats fed mashua showed that there was a 45% decrease in the testosterone/dihydrotestosterone ratio. The effect of this plant on reproduction is related to its content of isothiocyanates, compounds that bind covalently to proteins, which may be directly or indirectly involved in the spermatogenic process. The purpose of this research was to evaluate the effect of the aqueous extract of mashua on spermatogenesis and reproductive physiology of mice. **Methods:** The in vivo morphofunctional parameters of mouse sperm (spermatogram) were evaluated and the expression of: Cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase, protein that regulates acute steroidogenesis, cyclin and protamine, related to spermatogenesis, was quantified. **Results:** At 7, 14 and 21 days of dosing, the sperm count is affected, as well as their progressive motility (PM); on the other hand, a delay in their maturation was observed. Regarding gene expression, no significant differences were found between the expression of the two genes studied (cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase, cyclin). **Conclusion:** The effect of mashua does not occur at the level of the expression of the genes involved in spermatogenesis, but at the level of its functions as a protein.

Keywords: Genic expression; Mashua; Mouse; Spermatogenesis; *Tropaeolum tuberosum*; Medicinal Plants. (Source: MESH-NLM)

¹ Laboratorio de Reproducción y Biología del Desarrollo. Instituto de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi (ICBAR). Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Lima, Perú.

² Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA). Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. UNMSM.

³ Universidad Científica del Sur. Lima, Perú.

⁴ Laboratorio de Química Analítica. Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima, Perú.

^a Magíster en Biología Molecular

^b Biólogo

^c Doctor en Farmacia y Bioquímica

^d Magíster en Procedimientos en Reproducción Asistida

Citar como: Gonzales Daga J, Pino Gaviño J, Alvis Dávila R, Francia Quiroz J, Bell Cortez C, Pino Velásquez P, Shiga Oshige B. Efecto de *Tropaeolum tuberosum* o "Mashua" (Tropealaceae) sobre la expresión génica relacionada a espermatogénesis en ratón. Rev Fac Med Hum. 2023;23(3):68-72. doi:10.25176/RFMH.v23i3.5907

Journal home page: <http://revistas.urp.edu.pe/index.php/RFMH>

Artículo publicado por la Revista de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Ricardo Palma. Es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons: Creative Commons Attribution 4.0 International, CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con revista.medicina@urp.pe



INTRODUCCIÓN

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*) es un tubérculo de uso milenario y autóctono con un valor económico, alimenticio y medicinal, utilizado por los pobladores alto andinos⁽¹⁾. Se han aislado componentes de la mashua con propiedades como: antibióticos, nematicidas, diuréticos, insecticidas, además de los efectos encontrados sobre la testosterona en machos y estrógenos en las hembras. Mucho de los usos medicinales de la mashua están relacionados a la presencia de Isothiocianatos y glucosinolatos⁽²⁾. En los últimos años, se han venido mostrando que los isothiocianatos (compuestos organosulfurados) inducen apoptosis en varias líneas celulares cancerígenas en ratones⁽³⁾ y retardaron la progresión del ciclo celular⁽⁴⁾.

Estas características han sido relacionadas a la unión covalente a proteínas celulares⁽⁵⁾ y a la inhibición de enzimas con actividad y detoxificación carcinogénica, entre otros mecanismos que aún no han sido descritos⁽⁶⁾; por otra parte, estudios hechos en ratas con dietas con mashua mostraron un 45% de disminución de los niveles de testosterona/dihidrotestosterona⁽⁷⁾.

No existen antecedentes de efectos de mashua sobre la expresión de genes involucrados en la espermatogénesis; por ello, en el presente estudio, se evaluó la expresión génica de algunas proteínas importantes en el proceso de espermatogénesis, las cuales fueron cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17, que es muy importante para la biosíntesis de cortisol y esteroides sexuales⁽⁸⁾; por ello, será tomado como marcador de la biosíntesis de la testosterona; la proteína reguladora de esteroidogenesis aguda es un gen regulado por los receptores de andrógeno⁽⁹⁾; la ciclina es una proteína muy importante para la división celular y la protamina en el proceso de la espermatogénesis. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto del extracto acuoso de *T. tuberosum* sobre los parámetros morfofuncionales básicos de los espermatozoides: motilidad, morfología y concentración, y relacionarlos al efecto sobre la expresión de algunos genes involucrados en la espermatogénesis.

MÉTODOS

Diseño y área de estudio

Estudio experimental preclínico de casos y controles, en el área de biología experimental.

Población y muestra

La muestra estuvo conformada por 20 ratones machos (*Mus musculus*) de la cepa albina Swiss Rockefeller de 6-7 semanas de edad obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Salud, en Lima-Perú; el grupo casos (experimental) lo conformó 10 ratones, a quienes se les administró extracto acuoso mediante sonda nasogástrica N°18 (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA), en una concentración de 1000 mg/kg de peso corporal durante 21 días. Los especímenes se mantuvieron en condiciones de bioterio (temperatura ambiental 22 – 24° C, 14 h luz: 10 h oscuridad), con acceso libre a una dieta con pellets (Purina, Perú) y agua ad libitum.

Plantas

Se adquirieron tubérculos de mashua en mercados locales de Huancayo, en Perú. En el laboratorio, las plantas fueron certificadas por el Departamento de Botánica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Químicos

Alcohol etílico 70°, agua destilada, solución PBS (Phosphate buffer saline - Sigma), Kit DNA-freeTM (Ambion), SYBRGreen I, trizol.

Obtención del extracto

El tubérculo fue pesado y licuado, inmediatamente macerado con alcohol de 70° por dos días; posteriormente, se separó la fase líquida de la parte sólida. La primera fue llevada a la estufa para evaporar el alcohol y se obtuvo una pasta que fue considerada como compuesto patrón.

Diseño experimental

Los ratones se distribuyeron en cuatro grupos de tratamientos: uno fue grupo control negativo (CN), que fue tratado con agua destilada y los grupos tratamiento (T7, T14 y T21), a los que les administró el extracto acuoso (20%) de *T. tuberosum* por vía oral por 7, 14 y 21 días, respectivamente. Se registró el peso total, en g, de los ratones al inicio del tratamiento y el día de la evaluación. Después de cada tratamiento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se procedió a obtener las muestras: un testículo y un epidídimo fueron colocados en trizol dentro de un criovial (100 mg/ml) y guardado a -196° C en nitrógeno líquido hasta la extracción de ARN; a partir del segundo



epidídimo, se obtuvieron los espermatozoides para medir los parámetros espermáticos (concentración espermática y motilidad) según OMS (2010). La extracción del ARN se realizó mediante el trizol, según el protocolo para aislamiento de ARN de Invitrogen Cat. N° 15596-18. Una vez obtenido el ARN, se procedió a remover el ADN contaminante mediante el uso del Kit DNA-freeTM de Ambion, según el protocolo descrito en el Cat. N° AM 1906. A partir del ARN aislado libre de ADN contaminante, se procedió a la síntesis del cADN, para lo cual se empleó el RT PCR, protocolo descrito en Cat. N° 18080-051. La cuantificación se realizó por RT-PCR, en tiempo real, con el sistema LightCycler[®] 2.0 de Roche Applied Science, en donde el producto de PCR es detectado y medido por la señal fluorescente del SYBR Green I.

El principio de esto es que el SYBR Green I se une al surco menor de la doble hélice del ADN y se intercala en la hélice del ADN⁽¹⁰⁾; en la solución, el colorante exhibe una fluorescencia muy baja, sin embargo, la fluorescencia (a 530 nm de longitud de onda) es mejorada por la unión al ADN. Por ello, durante la PCR, el incremento de la fluorescencia del SYBR Green I es directamente proporcional a la cantidad de ADN doble cadena generado, y dicha emisión es detectada por el filtro óptico de sistema LightCycler[®] 2.0.

La cuantificación fue relativa al housekeeping, la expresión del gen de la beta actina, la cual teóricamente es expresada de manera constante en el tejido testicular del ratón, lo cual sirvió como punto de referencia para medir la expresión de los genes target. Esta medición

relativa es dada por la proporción de la expresión de los genes target sobre la expresión del gen housekeeping, en los grupos tratados en los periodos diferentes con el extracto acuoso de mashua en comparación con el grupo control.

Análisis estadístico

Se comprobó homocedasticidad (igualdad de varianzas) de los datos mediante el Test de Levene. Para comprobar si los datos obtenidos de las distintas variables a evaluar se distribuían normalmente, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Cuando la variable a evaluar presentaba distribución normal, se procedió a comparar las medias con T-student; en caso contrario, se aplicó U de Mann-Whitney para pruebas no paramétricas. Los resultados fueron expresados como media \pm EE (error estándar). Se usó el programa estadístico SPSS, versión 17.00, y se consideró el nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Aspectos éticos

El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo con las pautas éticas de nuestra institución y del Consejo Nacional de Investigación para el cuidado y uso de animales de laboratorio⁽¹¹⁾.

RESULTADOS

Peso corporal y órganos reproductivos

No se observaron diferencias significativas en el incremento del peso corporal, peso de los testículos, epidídimos y próstata ($p > 0,05$) entre los grupos analizados. Los resultados se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Diferencias de pesos corporal y de órganos reproductivos inicial y final (g).

Parámetros	Grupo control	Mashua 7 días	Mashua 14 días	Mashua 21 días
DifWs	8.27 \pm 1.500	6.39 \pm 1.180	8.7 \pm 1.630	9.02 \pm 1.350
DifWtestis	0.100 \pm .100	0.091 \pm 0.116	0.107 \pm 0.120	0.0987 \pm 0.130
DifWepid	0.037 \pm 0.067	0.033 \pm 0.064	0.0382 \pm 0.056	0.035 \pm 0.071
Wprost	0.0078 \pm 0.043	0.0072 \pm 0.036	0.0073 \pm 0.048	0.0071 \pm 0.042

Grupo Control 0% TT y Grupos Tratamiento 20% TT. Media \pm EE; analizado por T-student.

DifWs. Peso corporal WTestis: de los testículos; Wepid: de los epidídimos y Wprost: peso de la próstata



Tabla 2. Movilidad y concentración espermática.

Parámetros seminales	Grupo control	Mashua 7 días	Mashua 14 días	Mashua 21 días
Mot A	38.095 ± 2.057	34.976 ± 1.840	30.528 ± 1.936	25.017 ± 3.156 *
Mot B	14.856 ± 2.132	15.978 ± 2.080	20.573 ± 2.418	19.702 ± 2.879
Mot C	9.473 ± 1.673	9.57 ± 1.880	7.661 ± 1.875	5.167 ± 1.561
Mot D	37.576 ± 2.298	39.475 ± 2.577	41.238 ± 2.577	39.001 ± 3.868
Concent Sps	25.06 ± 2.260	19.11 ± 2.120	18.555 ± 1.539	13.455 ± 2.622 *

Grupo Control 0% TT y grupos tratamiento 20% TT. Media ± EE; analizado por T-student.

Mot A: motilidad tipo A; Mot B: motilidad tipo B, Mot C: motilidad tipo C, Mot D: motilidad tipo D, Concent Sps: Conteo de espermatozoides. *(p <0.05) ANOVA

Los resultados de cuantificación de expresión génica de dos de cuatro genes (cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase, ciclina) dieron como resultado una diferencia no significativa en comparación con el grupo control en la cuantificación relativa a la expresión de beta actina (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

El presente trabajo intenta investigar los efectos de una dosis única de *Tropaeolum tuberosum* o mashua en la calidad espermática y expresión génica durante la espermatogénesis del ratón; se consideraron los antecedentes antiandrogénicos de la mashua^(2,12). Por los resultados mostrados, no hay efectos tóxico sistémico sobre el peso corporal y órganos reproductivos.

El efecto del extracto acuoso de mashua disminuye la concentración espermática en los tres grupos de tratamiento a comparación del grupo control y es estadísticamente significativa para el de 21 días de tratamiento; en el parámetro de motilidad, también se observa una disminución de la motilidad progresiva y es de mayor incidencia en aquellos tratados por 21 días, en donde se observó un número mayor de espermatozoides inmaduros (presencia de gotas

citoplasmáticas, lo que podría explicar la baja en la motilidad progresiva. Estos efectos no estarían relacionados a un cambio en la expresión de genes involucrados en la espermatogénesis, ya que no se observó diferencias en la expresión de estos genes en comparación con el grupo control. Esto indicaría, por tanto, que el efecto de la mashua sobre la fisiología reproductiva tendría más bien un efecto postranscripcional, en el que estaría afectando a las proteínas que tienen un papel importante en este proceso, posiblemente por la acción de los compuestos organofosforados como isothiocianatos presentes en la mashua por la capacidad de estos de unirse de manera covalente a las proteínas e inactivando las actividades enzimáticas^(3,13-15).

Sin embargo, se requiere un mayor estudio al respecto; quizá la ampliación del rango de genes a estudiar, ya que si algunas proteínas son afectadas, podrían haber algunas relacionadas a factores de transcripción y afectar, así, la expresión de otros genes que estén directa o indirectamente relacionados al proceso de la espermatogénesis; así quizás esto podría explicar el efecto sobre la maduración de los espermatozoides observado en el trabajo, probablemente relacionado los receptores de estrógenos a nivel de epidídimo.

Contribuciones de autoría: Los autores participaron en la génesis de la idea, diseño del proyecto, desarrollo, recolección e interpretación de data, análisis de resultados y preparación del manuscrito.

Financiamiento: Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (proyecto

con fondos monetarios, código 091001301).

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Recibido: 11 de Julio, 2023.

Aprobado: 27 de Agosto, 2023.

Correspondencia: José Luis Rafael Pino Gaviño.

Dirección: Av. German Amézaga 375, Cercado Lima-Perú.

Teléfono: 992169186

Correo electrónico: jpino@unmsm.edu.pe

REFERENCIAS

1. King SE and Gershoff SN. 1987. Nutritional Evaluation of Three Underexploited Andean Tubers: *Oxalis tuberosum* (Oxalidaceae), *Ullucus tuberosus* (Basellaceae), and *Tropaeolum tuberosum* (Tropaeolaceae). *Econ. Bot.* 41(4): 503-511.
2. Johns T. and Towers GHN. 1981. Isothiocyanates and thioreas in enzyme hydrolysates of *Tropaeolum tuberosum*. *Phytochemistry* 20:2687-2689.
3. Nakamura Y and Miyoshi N. 2006. Cell death induction by isothiocyanates and their underlying molecular mechanisms. *Biofactors.* 26(2):123-34.
4. Zhang R, Loganathan S, Humphreys I et al. 2006. Benzyl isothiocyanate-induced DNA damage causes G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *J Nutr* 136:2728-2734.
5. Mi L, Wang X, Govind S, Hood B et al. 2007. The Role of Protein Binding in Induction of Apoptosis by Phenethyl Isothiocyanate and Sulforaphane in Human Non-Small Lung Cancer Cells. *Cancer Res* 67(13):6409-16. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-07-0340](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0340).
6. Zhang Y. 2004. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat. Res.*, 555, 173-190.
7. Johns T, Kitts WD, Newsome F and Towers GHN. 1982. Anti-reproductive and other medicinal effects of *Tropaeolum tuberosum*. *J. Ethnopharmacol.* 5(2): 149-161.
8. Liu Y, Yao ZX, Bendavid C, Borgmeyer C, Han Z, Cavalli LR, Chan WY, Folmer J, Zirkin BR, Haddad BR, Gallicano GI and Papadopoulos V. 2005. Haploinsufficiency of Cytochrome P450
9. Zhou Q, Shima JE, Nie R, Friel PJ and Griswold MD. 2005. Androgen-Regulated Transcripts in the Neonatal Mouse Testis as Determined Through Microarray Analysis. *Biol Reprod* 72: 1010-1019.
10. Zipper et al., 2004
11. National Research Council. 1989. *Lost Crops of the Incas: Little Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. National Academy Press, Washington D. C.
12. Vásquez, J., Gonzales, J. & Pino J. 2012. Decrease in spermatid parameters of mice treated with hydroalcoholic extract *Tropaeolum tuberosum* "mashua". *Revista Peruana de Biología* 19(1):89-93. DOI: [10.15381/rpb.v19i1.792](https://doi.org/10.15381/rpb.v19i1.792)
13. Zhang Y, Talalay P. 1998. Mechanism of differential potencies of isothiocyanates as inducers of anticarcinogenic Phase 2 enzymes. *Cancer Res* 58:4632-9.
14. Zhang Y, Tang L and Gonzalez V. 2003. Selected isothiocyanates rapidly induce growth inhibition of cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2:1045-52.
15. Zhang Y, Li J and Tang L. 2005. Cancer-preventive isothiocyanates: dichotomous modulators of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 38:70-7.