



Universidad Andina del Cusco

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Psicología



**Evaluación del potencial efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en la  
reducción de daño cerebral, conservación de la respuesta sensorio - motora y alivio  
del deterioro de memoria y aprendizaje espacial causados por isquemia cerebral focal  
en ratas, Cusco – 2021.**

Tesis presentada por: Bach. Flavia Alejandra Castro García

ORCID: 0000-0003-4473-8317

Para optar al título profesional de psicóloga

Asesora: MSc. Katerin Taboada Rosell

ORCID: 0000-0002-3700-2937

Co-asesora: Dra. Grace Violeta Espinoza Pardo

ORCID: 0000-0002-8840-3386

**Cusco – 2022**



### Agradecimientos

*A la Universidad Andina del Cusco por toda la formación recibida en sus aulas. Así mismo, por la oportunidad de llevar a cabo este estudio a través del laboratorio de investigación en neurociencias y del uso del bioterio automatizado, que me brindaron el espacio y asesoramiento necesario para continuar en mi formación como investigadora.*

*Al equipo del laboratorio de investigación en neurociencias por su constante capacitación y discusión de resultados de esta investigación, en especial al Dr. Luis Fernando Pacheco por su orientación e impulso académico.*

*A mis asesoras MSc. Katerin Taboada y Dra. Grace Pardo por sus enseñanzas, orientación y esfuerzo para la ejecución de esta investigación.*

*Al Dr. Edgard Pacheco Luza por sus aportes y acompañamiento a través del rol de dictaminante de esta tesis.*

*Al equipo del Bioterio automatizado, Lic. Luis Alfaro y equipo técnico conformado por Virgilio y Daniel, por su esforzado y dedicado trabajo que sumó a la ejecución de esta investigación.*



## Dedicatoria

*Dedicado a mis padres, que con su valiente esfuerzo, aliento y amor guiaron mis pasos e impulsaron mis metas.*

*A mis abuelos, porque aquí también está el fruto de su esfuerzo.*

*A Di, por siempre tener la voluntad de impulsarme.*

*A Franko, por su cálido amor y apoyo incondicional.*

*A mis queridas Xime, Ale, Moni y Vale por su reconfortante amistad.*

*A Martha, por enseñarme que el aprendizaje es continuo y la ética fundamental.*

*A mi familia, por ser mi apoyo y la alegría de vivir.*

*Y, a quien, cada día me inspira a ser una mejor versión de mí.*



## RESUMEN

El accidente cerebrovascular es una de las principales causas de muerte y discapacidad en todo el mundo. Estudios previos han demostrado el efecto neuroprotector del extracto de pentánico de *Lepidium meyenii* (maca) así como de sus macamidas aisladas. El presente estudio busco conocer el efecto protector de una macamida sintética N-benciloctadecanamida (MCH1) sobre la conservación morfológica, déficits sensorio-motores y alteraciones en memoria y aprendizaje espacial. Para ello se utilizó el modelo de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) para inducir isquemia cerebral focal en ratas Sprague Dawley. Se administró una dosis intraperitoneal de 3 mg/kg de MCH1 antes de la oclusión; esta dosis se repitió cada 24 horas durante 10 días. Se aplicó una batería de evaluaciones neurológicas el día 3 y el día 10 después del accidente cerebrovascular (ACV) y las evaluaciones cognitivas se realizaron pre y post ACV. Los resultados muestran que el tratamiento con MCH1 reduce el área de infarto significativamente al día 10 post lesión, específicamente en las áreas de la corteza motora y sensorial. Asimismo, el tratamiento con MCH1 tiende a reducir el déficit sensorial y motor de las ratas MCAO. Los animales sometidos a MCAO no mostraron déficit en el aprendizaje y memoria espacial y el tratamiento con MCH1 no indujo ningún efecto en estos procesos cognitivos. Estos hallazgos sugieren que la aplicación de MCH1 tiene un potencial efecto neuroprotector frente a una isquemia cerebral focal, reduciendo el proceso de injuria y aliviando el área de infarto y contribuyendo a la conservación de algunas funciones sensorio-motoras.

**Palabras claves:** MCAO – sensoriomotor – macamidas – neuroprotección – aprendizaje espacial – memoria espacial – altura.



## ABSTRACT

Strokes are one of the leading causes of death and disability worldwide. Previous studies have shown the neuroprotective effect of *Lepidium meyenii* pentane extract (maca) as well as its separate macamides. The present study aims to ascertain the protective effect of a synthetic macamide N-benzyloctadecanamide (MCH1) on morphological conservation, sensory-motor and disturbs on spatial learning and memory. To this end, the middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was produced to induce focal cerebral ischemia in Sprague Dawley rats. An intraperitoneal dose of 3 mg/kg of MCH1 was administered prior to occlusion; this dose is repeated every 24 hours for 10 days. A battery of neurological assessments was applied on day 3 and day 10 after stroke, and cognitive assessments were performed pre- and post-stroke. The results show treatment with MCH1 reduces significantly the infarct area at day 10 post stroke, specifically in sensory and motor cortex. MCH1 treatment also reduce sensory-motor deficit in stroke rats. MCAO animals haven't showed any change in cognitive function. These results suggest a potential neuroprotective effect of macamide MCH1 against focal ischemic damage, reducing the injury process and limiting the infarct area, as well as the preserved the sensory-motor function.

**Keywords:** MCAO - sensory-motor - macamides – neuroprotection – spatial learning – spatial memory – high altitude.



## PISIYACHISQA

Accidente cerebrovascular (ACV) nisqa unquyqa hukninmi aswan hatun wañuykunamanta, mana puriy atiqkunamantapas tukuy pachapi. Ñawpaq yachaykunaqa rikuchirqanku kay waqaychay kaqta kay extracto de *Lepidium meyenii* pentano kaqmanta (maca) kay macamidas aisladas kaqninmantawan ima. Kay proyectuqa yachayta munan macamidaq efecto protector sintética N-benciloctadecanamida (MCH1) nisqamantan uma masa chinkachiyanta, kaqlataq sienteyta, kuyuytapas chinkachiy, chay kitimanta yuyariy, yachay chinkachiy nisqapuwan. Chaypaqmi ajllakurqan kay yawar puriy hark'asqa uma sirk'akunapi arteria cerebral media nisqapi (MCAO) Sprague Dawley huk'uchakunapi isquemia cerebral focal nisqata tanqanapaq. Huk churay 3 mg/kg MCH1 nisqatan intraperitonealninta qoqun manaraq yawar puriy hark'asqa kachaqtin; kay churayqa sapa iskay chunka tawayoq hurasmi kanan chunka p'unchayta. Imaynatas musyanata, kuyuyta ima afectaran chayta yachanapaq kaqta churakurqan kinsa p'unchayninta chaymanta 10 p'unchaynintataq kay ACV kaqmanta churakun, chaymantan kay yuyariypas yachaypas imayna tikrakusqanmanta qawarinapaq ñaupaqta-qhepata ACV nisqa ruwakurqan. Kay ruwasqakuna rikuchinku ancha hujniray riqsisqa chiqan amacharqanmi umaq masanta, hinallataq uywakunaq sienteyta, kuyuytapas nisqa MCH1wan hampisqa huk'uchakunapi, ichaqa, manan tarikunchu hamut'ayninkupi hujniray rewsisqakunaqa. Ichaqa, chay tarikuykunaqa rikuchinku kay macamidaq waqaychay nisqata ictus nisqa uma mana allin kaypi, hinallataq, kay musyayta, kuyuytapas waqaychasqa kaqmantawan.

**Sapaq simikuna:** MCAO - sensacionta - kuyuytapas – macamidas – neuroprotección – yachay kiti – kiti yuyarina – sayaynin.



## Índice

Relación de tablas	i
Relación de figuras	ii
Capítulo I: Introducción	1
1.1 Planteamiento del Problema	1
1.2 Formulación del Problema	7
1.2.1 Problema general	7
1.2.2 Problemas específicos	7
1.3 Justificación	7
1.4 Objetivos de la Investigación	8
1.4.1 Objetivo general	8
1.4.2 Objetivos específicos	8
1.5 Delimitación del Estudio	9
1.5.1 Delimitación espacial	9
1.5.2 Delimitación temporal	9
1.6 Aspectos Éticos	9
1.7 Viabilidad	9
Capítulo II: Marco Teórico	10
2.1 Antecedentes del Estudio	10
2.1.1 Antecedentes internacionales	10
2.1.2 Antecedentes nacionales	12
2.2 Bases Teóricas	13



2.2.1	Accidente Cerebro Vascular	13
2.2.2	Neuroprotección	15
2.2.3	Sistema sensorio - motor	17
2.2.4	Memoria espacial	18
2.2.4.1	Psicobiología de la memoria	19
2.2.4.2	Teoría de los mapas cognitivos	20
2.2.5	Aprendizaje espacial	22
2.2.5.1	Psicobiología de los mapas cognitivos	23
2.2.5.2	Estrategias de navegación	24
2.2.6	Hipocampo	26
2.2.7	Lepidium meyenii (maca)	27
2.2.8	Sistema endocannabinoide	29
2.3	Hipótesis	30
2.3.1	Hipótesis general	30
2.3.2	Hipótesis específicas	31
2.4	Variables	31
2.4.1	Identificación de variables	31
2.4.2	Operacionalización de variables	31
2.5	Definición de Términos Básicos	32
Capítulo III: Método		33
3.1	Alcance del Estudio	33



3.2	Diseño de Investigación	33
3.3	Sujetos	34
3.4	Muestra	34
3.5	Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	36
3.5.1.	Procedimiento quirúrgico por oclusión de la arteria cerebral media	36
3.5.2.	Tratamiento con macamida sintética	37
3.5.3.	Evaluación sensorio - motora	38
	a. Escala neurológica de García modificada	38
	b. Prueba de retirada de cintas adhesivas	39
	c. Prueba de caminata en malla	40
3.5.4.	Laberinto de Barnes	41
3.5.5	Evaluación de daño morfológico	43
3.6	Validez y confiabilidad de instrumentos	44
3.7	Plan de Análisis de Datos	44
	Capítulo IV: Resultados	46
4.1	Resultados respecto a los objetivos específicos	46
	4.1.1 Efecto de MCH1 neuroprotector sobre la reducción del área de infarto	46
	4.1.2 Efecto de MCH1 sobre la respuesta sensorio - motora	48
	4.1.3 Efecto de MCH1 sobre el aprendizaje espacial	63
	4.1.4 Efecto de MCH1 sobre la memoria espacial	66
4.2	Resultados respecto al objetivo general	71
	Capítulo V: Discusión	73



5.1 Descripción de los hallazgos más importantes de la investigación	73
5.2 Limitaciones del estudio	75
5.3 Comparación crítica con la literatura existente	76
5.4 Implicancias del estudio	82
Conclusiones	84
Recomendaciones	85
Referencias bibliográficas	86
Anexos	101



### Relación de tablas

Tabla 1: Operacionalización de variables	31
Tabla 2: Análisis del tamaño de muestra	35
Tabla 3. Escala neurológica de García modificada	38
Tabla 4. Protocolo del Laberinto de Barnes	42
Tabla 5: Volumen de infarto por corte cerebral	48
Tabla 6: Resultados de la escala neurológica de García modificada	51
Tabla 7: Evaluación sensorio-motora de prueba de retirada de cintas	59
Tabla 8: Prueba de caminata en malla día 3 y 10	62
Tabla 9: Test de Barnes - test de adquisición y reverso	65
Tabla 10: Evaluación sensorio-motora de prueba de retirada de cintas	66
Tabla 11: Test de Barnes - Entrenamiento de adquisición y reverso	70
Tabla 12: Test de Barnes - Errores primarios	70
Tabla 13: Efecto agudo de MCH1 en las dimensiones de la variable dependiente	72
Tabla 14: Matriz de consistencia	101



## Relación de figuras

Figura 1: Diseño experimental	34
Figura 2: Análisis del tamaño de muestra	36
Figura 3: Porcentaje de área de infarto	46
Figura 4: Porcentaje de infarto por corte coronal	48
Figura 5: Escala neurológica de García	50
Figura 6: Escala neurológica de García - puntuación modificada	51
Figura 7: Simetría del lado contralateral vs ipsilateral	55
Figura 8: Recuperación sensorio - motora independiente al tratamiento	56
Figura 9: Prueba de retirada de cinta adhesiva del lado contralateral – sensibilidad	57
Figura 10: Prueba de retirada de cinta adhesiva del lado contralateral – motricidad	58
Figura 11: Prueba de retirada de cinta adhesiva del lado ipsilateral – motricidad	60
Figura 12: Prueba de caminata en malla pata delantera contralateral	62
Figura 13: Test de Barnes - latencia primaria	64
Figura 14: Test de Barnes - errores primarios	65
Figura 15: Tiempo acumulado en Test de Barnes	67
Figura 16: Tiempo acumulado en Test de Barnes desempeño por grupos	69



## Capítulo I: Introducción

### 1.1 Planteamiento del Problema

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2005) define los accidentes cerebrovasculares (ACV) como la afección neurológica focal o general de aparición súbita y de presunto origen vascular, que perdura más de 24 horas o causa la muerte. El ACV es un desorden neurológico caracterizado por el bloqueo de los vasos sanguíneos, que interrumpe el flujo sanguíneo y en consecuencia puede originar muerte celular por hipoxia o sangrado. Es la tercera causa de muerte en todo el mundo y la principal causa de enfermedad crónica grave y discapacidad a largo plazo en adultos, además su tratamiento y recuperación genera costos elevados de gran impacto socioeconómico (Stocchetti et al., 2015, García Alfonso et al., 2019, Kuriakose & Xiao, 2020).

Durante las últimas cuatro décadas la incidencia del ACV se ha incrementado en 100% en países de bajos y medianos ingresos económicos. (Ferri et al., 2011). Tal es el caso de México que, según la Secretaria de Salud Mexicana, la tasa de mortalidad por ACV se ha incrementado a partir del año 2000, particularmente en menores de 65 años (citado en Arauz & Ruíz-Franco, 2012). Del mismo modo en Colombia, Epineuro publicó un estudio en el 2003 donde determinó la prevalencia de ocho problemas neurológicos frecuentes, teniendo al ACV con una prevalencia del 19,9%, siendo más frecuente en mayores de 50 años (citado en García Alfonso et al., 2019).

Perú no ha sido ajeno a este panorama, pues el Ministerio de Salud informó un incremento en la mortalidad por ACV entre los años 2000 y 2006 (citado en Castañeda et al., 2011). Así mismo, los accidentes cerebrovasculares tienen una prevalencia de 6,8 % en zona urbana y 2,7% en zona rural en personas mayores de 65 años, representando el 28,6%



y 13,7% de las causas de muerte, respectivamente (Ferri et al., 2011). En un estudio de tendencia de mortalidad por enfermedad cerebrovascular de los reportes del Ministerio de salud (MINSA) reportan que en el periodo 2005-2015 se registraron 1.273.996 defunciones, de las cuales 47.956 (3,8%) tuvieron como causa básica la enfermedad cerebrovascular, siendo el 48,9% del sexo femenino y el 72,8% personas mayores 60 años (Atamari, Alva, Vera, & Taype, 2019). Así mismo en el año 2018, el Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud e Investigación (IETSI) reportó que entre el 15% y 19.6% de todas las muertes prematuras en Perú son causadas por la enfermedad cerebrovascular.

En la región de Cusco, no se cuentan con muchos reportes epidemiológicos de enfermedad cerebro vascular. Sin embargo, Jaillard, Hommel,y Mazetti (1995) refieren que mientras que la OMS consideraba una prevalencia de 5,74 por 1000 habitantes, su estudio en la región reflejo una prevalencia cruda de 6.47 por 1000 habitantes, siendo una prevalencia mayor a la esperada en la región. Así mismo, señalan que la policitemia, el consumo de alcohol y la zona de residencia dan una mayor vulnerabilidad en esta población. Posteriormente, recientes estudio señalan que en el período 2005 – 2015 hubo una reducción del 16,4 al 5,3 de mortalidad por 100 000 habitantes, aunque cabe resaltar que los autores señalan que solo se utilizaron los reportes del sector MINSA, por lo que podría no reflejar la problemática real (Atamari et. al, 2019).

El accidente cerebrovascular se caracteriza por tener signos y síntomas de aparición súbita, como dolor de cabeza intenso sin causa conocida, mareo, dificultad para hablar o entender, problemas al caminar o pérdida de equilibrio, entre otros (National Institute of Neurological Disorders and Stroke [NINDS], 2020). Según su fisiopatología se puede distinguir dos tipos: ACV isquémico (ACVi) y ACV hemorrágico (ACVh), siendo el



primero el más frecuente con 85% de los casos, producido por un decremento o interrupción del flujo sanguíneo; el segundo corresponde al 15% de los casos y es originado por la ruptura de un vaso sanguíneo en el parénquima cerebral (Haldal et al., 2018).

Durante la isquemia el flujo sanguíneo cerebral (FSC) disminuye, y dependiendo del tiempo va causando daño celular progresivo hasta la muerte. A los pocos minutos del inicio del ACVi se produce un núcleo isquémico de muerte celular irreversible (centro isquémico) y la zona localizada alrededor de este se denominada área de penumbra. Esta última tiene mayores posibilidades de recuperación ya que la disminución del flujo sanguíneo es menor. El área de penumbra es una zona tiempo-dependiente que se ira destruyendo progresivamente, como consecuencia de una compleja sucesión de alteraciones bioquímicas (Arango et al., 2004; Castillo, 2001; Haldal et al., 2018).

Tales alteraciones bioquímicas hacen referencia a la cascada isquémica, desencadenada por la disminución del FSC, que, al causar un déficit de oxígeno y glucosa en la célula, disminuye la producción de adenosín trifosfato (ATP). Esta disminución energética despolariza la neurona ocasionando una entrada masiva de calcio a través de canales dependientes de voltaje, induciendo la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato. A su vez este neurotransmisor activa a sus receptores AMPA y NMDA. La activación de este último incrementa la conductancia del calcio para dentro de la célula, el cual facilita la liberación y concentración de calcio libre intracelular, un factor que conducirá al daño neuronal irreversible (Leciñana, 2012).

En consecuencia, las secuelas de una isquemia cerebral pueden abarcar daños desde el funcionamiento motor y sensitivo hasta un deterioro cognitivo o el desarrollo de una demencia, calculando que aproximadamente entre el 25% – 50 % de las personas con ictus van a desarrollar una demencia vascular relacionada con el fallo cognitivo previo



(Martínez-Díaz, García, Hernández, & Aranda-Abreu, 2015). Si bien al momento del diagnóstico la atención y las funciones ejecutivas se muestran más alteradas, en intervalos posteriores la memoria también se verá afectada, reportando una prevalencia de daño del 23% al 55% en los 3 meses posteriores y una disminución del 11% al 31% pasado un año del ACV (Al-Qazzaz et. al, 2014).

Teniendo en cuenta el daño reportado en la memoria, cabe señalar que hay estudios que muestran una diferencia de vulnerabilidad a la isquemia de algunos grupos neuronales como el sector del Cuerno de Amón 1 (CA1) del hipocampo, las láminas III y V de la corteza, y el estriado (Arango et al., 2004). En este sentido, la formación hipocampal tiene funciones cognitivas relacionadas al aprendizaje y la memoria, específicamente en la creación de nuevos recuerdos, estando relacionado al procesamiento de la memoria declarativa y espacial (Seo et al., 2014; Solís & López - Hernández, 2009). Por consiguiente, la memoria y el aprendizaje serían funciones sensibles a quedar alteradas después de un ACVi, motivo por el que dichas funciones serán de interés en este estudio.

Las áreas cerebrales relacionadas a la memoria y aprendizaje están vinculada a circuitos hipocampales, los primeros descubrimientos de esta relación se dieron a través de casos clínicos reportados que permitieron determinar estas asociaciones como el caso del paciente H.M. Sin embargo, la asociación entre sistema nervioso y procesos cognitivos había sido señalada con anterioridad, con trabajos como el de Donal Hebb, quien ya desde 1949 postulaba las bases neuronales del condicionamiento clásico, señalando que las neuronas tienden a incrementar su descarga ante una neurona activa, y con la repetición de esta tendencia formaban rutas neurales. Al tiempo que, Edward Tolman estudiaba el aprendizaje en modelos animales, a diferencia de sus colegas quienes explicaban el comportamiento de las ratas en los laberintos por una conexión de estímulo respuesta, él



señalaba mecanismos internos que funcionan como un mapa del ambiente, y este mapa tentativo indica rutas, vínculos del ambiente que determinaban la respuesta, postulando a los “mapas cognitivos” como el componente cognitivo que organizaba la experiencia para guiar el comportamiento. Años más tarde, este constructo fue explorado en los trabajos de O’Keefe y Dostrovsky (1971), donde evidenciaron que cada vez que el animal se dirigía a un lugar específico un grupo de células hipocampales se activaba; posteriormente los estudios de Moser y Moser identifican que este sistema neuronal consta de múltiples células funcionalmente especializadas (Tolman, 1948; O’Keefe & Dostrovsky, 1971; Milner, 2005; Schiller et. al, 2015; Moser et. al, 2017).

El aprendizaje y la memoria son diferentes aspectos de un mismo fenómeno neuroplástico (Pinel, 2001), siendo la memoria la responsable de codificar, almacenar y evocar la información percibida (Portellano & García, 2014) y el aprendizaje la adquisición de nueva información que produce cambios relativamente permanentes en la conducta (Redolar, 2014). Ambas funciones son esenciales para un óptimo desenvolvimiento de la persona, permitiendo que organice y manipule información en la vida cotidiana. En un ACVi estos procesos pueden presentar alteraciones dependiendo del área vascular afectada, algunos de los síntomas reportados son disfunciones que suelen ser severas y generalizadas en la fase aguda como amnesia retrograda, anterógrada, diversos tipos de agnosia o afasias que posteriormente evolucionan a síntomas más específicos, que según el hemisferio afectado, se presentan como amnesia verbal, amnesia autobiográfica o apraxia en lesiones del hemisferio izquierdo y como alexia, anomia, agrafia o déficit de la memoria visual y espacial en lesiones del hemisferio derecho. Así mismo, se conoce que incluso pacientes con aparente éxito en su recuperación presentan compromiso de memoria meses o años posterior al ictus, reportando por ejemplo deterioro en la memoria de trabajo, así como en



la codificación y recuperación a largo plazo (Chun & Michael,2009; Amici,2012; Jokinen et. al,2015; Lugtmeijer et. al, 2021).

Por este motivo la búsqueda de tratamientos para ACVi sigue siendo de gran importancia. Actualmente, el único tratamiento de eficacia probada durante la fase aguda del ACVi es la administración de activador tisular del plasminógeno humano (rt-PA) intravenoso. También han sido de interés los tratamientos de neuroprotección, como una medida profiláctica que inicia durante el período peri-isquémico con el fin de mejorar la supervivencia neuronal. Sin embargo, aún no hay una terapia efectiva y tampoco medidas de neuroprotección no farmacológica para ACV, aunque sean ampliamente recomendadas (Castillo, 2001; Arias-Rodríguez et al., 2012; Yamashita y Abe, 2016).

Respecto a posibles tratamientos neuroprotectores, últimos estudios demostraron que el extracto pentánico de la *Lepidium meyenii* (Maca) posee una actividad neuroprotectora. La maca presenta dentro de su composición ácidos grasos de carácter lipofílico llamadas macamidas, que actúan sobre el sistema endocannabinoide como inhibidores de la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). Estudios posteriores sugieren la posible aplicación de macamidas aisladas como inhibidores de la FAAH, que a su vez regularía la liberación de neurotransmisores excitadores, principalmente glutamato, inhibiendo la excitotoxicidad producida por la gran liberación de dicho neurotransmisor durante la isquemia, siendo un posible tratamiento para ACVi (Pino-Figueroa et. al, 2013).

De este modo el presente estudio fue realizado en la línea de investigación de salud integral, donde se evaluó el potencial efecto neuroprotector de la macamida sintética a través de la evaluación de la conservación morfológica, de la respuesta sensorio-motora y de la preservación de memoria y aprendizaje espacial en un modelo de ratas, cepa *Sprague Dawley*, inducidas a isquemia cerebral focal por oclusión de la arteria cerebral media



(MCAO). Para este fin se utilizaron las técnicas y conocimientos de los campos de la psicología cognitiva, la psicobiología y la psicología experimental.

## **1.2 Formulación del Problema**

### ***1.2.1 Problema general***

¿Existe efecto neuroprotector en la administración de macamidas sintéticas en ratas sometidas a modelo de isquemia cerebral focal, que reduzca el daño cerebral, conserve la función sensorio-motora y alivie el deterioro de memoria y aprendizaje espacial?

### ***1.2.2 Problemas específicos***

- ¿Puede la administración de macamida sintética reducir el daño cerebral causado por la isquemia cerebral focal?
- ¿Puede la administración de macamida sintética aliviar el deterioro de la función sensorio-motora causado por la isquemia cerebral focal?
- ¿Puede la administración macamida sintética aliviar el deterioro de memoria espacial causados la isquemia cerebral focal?
- ¿Puede la administración macamida sintética aliviar el deterioro de aprendizaje espacial causados la isquemia cerebral focal?

## **1.3 Justificación**

El presente proyecto busca continuar con una línea de investigación en la que se pueda ampliar el conocimiento sobre el efecto neuroprotector de las macamidas sintéticas a nivel de memoria y aprendizaje en un modelo animal experimental de ACV isquémico focal. Dado que estas funciones son vulnerables en un ACV y su disfunción limitaría el desenvolvimiento óptimo de la persona, esta investigación se enfocará en estas áreas.



Como se mencionó los accidentes cerebrovasculares, sobre todo isquémicos, tienen una alta prevalencia a nivel mundial y son la principal causa de discapacidad. Considerando además que existe solo una terapia para ACVi y sigue siendo objeto de interés encontrar fármacos neuroprotectores, esta investigación busca aportar, a largo plazo, el desarrollo de un posible tratamiento que de un mejor pronóstico a la enfermedad cerebrovascular.

Uno de los aspectos más interesantes de este proyecto, es su valor metodológico. Puesto que en la escuela profesional de Psicología es poco común la realización de investigaciones con diseño experimental puro, tanto por motivos de complejidad y dificultades de accesibilidad a las condiciones que este tipo de investigación requiere. Por lo tanto, esta investigación tendrá una utilidad metodológica, quedando como un precedente para futuras investigaciones con este mismo diseño.

Por último, recalcar su valor teórico, puesto que la enfermedad cerebrovascular y sus tratamientos son poco estudiados en Perú, pese a ser considerada una problemática a nivel mundial y en especial para países en vías de desarrollo, hay poca atención a nivel nacional. Viéndose reflejado en la falta de datos epidemiológicos, así como una ausencia de publicaciones recientes al respecto. En este sentido, la presente investigación tiene como finalidad ampliar el conocimiento respecto al ACV isquémico y la búsqueda de posibles tratamientos neuroprotectores por medio del uso de macamidas sintéticas.

## **1.4 Objetivos de la Investigación**

### ***1.4.1 Objetivo general***

Evaluar el potencial efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en la reducción del área de infarto, conservación de la respuesta sensorio-motora y alivio del deterioro de memoria y aprendizaje espacial causados por isquemia cerebral focal en ratas.

### ***1.4.2 Objetivos específicos***



- Evaluar el efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en la reducción del área de infarto por isquemia cerebral focal, Cusco - 2021.
- Evaluar el efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en la conservación sensorio-motora en un modelo isquemia cerebral focal, Cusco - 2021.
- Evaluar el efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en el alivio de deterioro de memoria espacial causados por isquemia cerebral focal, Cusco - 2021.
- Evaluar el efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en el alivio de deterioro de aprendizaje espacial causados por isquemia cerebral focal en ratas, Cusco - 2021.

## **1.5 Delimitación del Estudio**

### ***1.5.1 Delimitación espacial***

Este proyecto se realizará en el Laboratorio de Investigación en Neurociencias, Universidad Andina del Cusco.

### ***1.5.2 Delimitación temporal***

Este proyecto será desarrollado desde enero del 2021 - abril del 2022.

## **1.6 Aspectos Éticos**

El proyecto fue sometido al comité de ética de la Universidad Andina del Cusco, cumpliendo los estándares sobre el uso de animales en experimentación y siendo aprobado mediante resolución N° 604-CU-2019-UAC con código de proyecto 00120 – CIEI.

## **1.7 Viabilidad**

Este trabajo fue financiado por PROCENCIA - CONCYTEC en el marco de la convocatoria Proyecto Investigación Básica, 2019-01 [Contrato N° 432-2019-FONDECYT].



## Capítulo II: Marco Teórico

### 2.1 Antecedentes del Estudio

#### 2.1.1 Antecedentes internacionales

Los accidentes cerebrovasculares representan un importante problema para la salud pública, estando entre las principales causas de mortalidad y discapacidad a nivel mundial. Al ser tal su importancia, son múltiples los estudios que se han realizado en la búsqueda de posibles tratamientos, desde intervenciones que puedan restablecer el flujo sanguíneo hasta tratamientos neuroprotectores que limiten el daño isquémico. Si bien se han obtenido resultados prometedores en estudios pre – clínicos, al pasar a fase clínica no se han obtenido los resultados esperados (Castillo, 2001; Pellegrini et al., 2004; Kaur et. al, 2013; Moretti et. al, 2015).

Al respecto, estudios recientes reportan que el extracto pentánico de maca (macamidas) posee efecto neuroprotector, por medio de estudios in vitro en neuronas de cangrejo sometidas a estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e in vivo en ratas con accidente cerebrovascular isquémico, observando que la dosis de 3mg/kg de extracto pentánico de maca demostró un efecto neuroprotector significativo, mientras que en dosis de 10 y 30 mg/kg incrementaron el daño cerebral (Pino-Figueroa et al., 2010).

A estos resultados, se suman posteriores estudios donde se observó un efecto neuroprotector del extracto pentánico de maca en ratas pretratadas por 21 días con dosis de 0,5 mg/kg, evidenciando una reducción del 40% en el área de infarto, sin embargo, con dosis 1 mg/kg se observó una mayor extensión del área de infarto (Cunhas, 2015). En esta línea de investigación, se agrega evidencia que ratas tratadas inmediatamente con dosis de 5mg/kg de extracto pentánico de maca y dosis diarias de 1mg/kg durante 10 días consecutivos, tuvieron una disminución del 77,37% del área de infarto, así como



preservación de las neuronas hipocampales que se vieron relacionadas a la conservación de memoria en las ratas (Taboada, 2016).

Respecto al mecanismo de acción relacionado a esta función neuroprotectora de la maca, está el descubrimiento de la N-3-metoxibencil-linoleamida (una de sus macamidas) que actuaría como un inhibidor de la FAAH, la cual degradaría los endocannabinoides que en consecuencia podrían modular neurotransmisores como el glutamato (Almukadi et al., 2013).

Un estudio de neuroprotección con otras macamidas sintéticas fue realizado por Jiao y colaboradores (2021), donde utilizó un modelo de animales neonatos inducidos a isquemia hipóxica, con tratamiento con una macamida sintética aislada denominada “NB-EPA”, donde aplicaron una dosis inicial en la cirugía de oclusión y 3 días posteriores. Sus hallazgos encontraron que el grupo tratado con dicha macamida sintética obtuvo una mejor conservación del área cerebral afectada, con un daño medio del vehículo fue 30,01% y el del grupo tratado con la macamida “NB-EPA” de un 11,13%, además reportó que el tratamiento también mostró mejoras en la evaluación neurológica.

La memoria y aprendizaje espacial también fue evaluada en otros modelos de inducción de accidente cerebrovascular, tal es el caso de Lu y colaboradores (2016), quienes aplicaron un modelo de oclusión bilateral de la arteria cerebral media en ratas y exploraron estos procesos a los 10 días de la oclusión bilateral utilizando el laberinto de Barnes. Este modelo induce una simulación de isquemia global, donde encontraron déficit tanto en memoria como aprendizaje espacial, al realizar 3 días de entrenamiento, 7 posteriores a la inducción.



### 2.1.2 *Antecedentes nacionales*

En Perú los accidentes cerebrovasculares son un problema de salud pública, anualmente es una de las principales causas de muerte, además ocasiona la discapacidad de un alto porcentaje de pacientes y produce gran impacto socioeconómico (Castañeda et al, 2011).

Respecto a los usos de la maca, se observó el efecto del extracto acuoso de maca sobre la función cognitiva en ratas recién destetadas, encontrando que los metabolitos del extracto de maca amarilla disminuyen la actividad de la enzima butirilcolinesterasa, que, según la literatura, su actividad aumentada se relaciona con la pérdida de memoria y aprendizaje; este mismo estudio reporta un efecto neuroprotector de la maca sobre los mecanismos de defensa antioxidante (Oré et al., 2011).

Posteriormente Taboada y Tejeda (2013) reportaron un efecto anticonvulsivante del extracto pentánico de maca en ratas inducidas a epilepsia de lóbulo temporal por pilocarpina, señalando que la dosis de 1mg/kg demostró una disminución significativa en la frecuencia de las crisis. Más tarde, Moscoso Palacios (2019) investigó el efecto de dos macamidas sintéticas (3-metoxi-N-bencilinoleamida y 3-metoxi-Nbenciloleamida) en un modelo de epilepsia inducido en ratas, reportando que ambas macamidas, aunque en diferentes dosis, tienen un efecto anticonvulsivante a través del sistema endocannabinoide, disminuyendo la intensidad del status epilépticus.

En referencia a la relación de la maca y el sistema endocannabinoide, Alarcón Yaquetto (2016) realizó una investigación en humanos y ratones, donde prueba que la maca inhibe la FAAH y comprueba su acción a través del sistema endocannabinoide.

Considerando este mecanismo de acción de las macamidas, Vera (2018) evaluó el efecto neuroprotector del extracto pentánico de maca amarilla, negra, roja y macamidas sintéticas



en un modelo in vitro de células de neuroblastoma SH-SY5Y inducidas a neurotoxicidad por péptido beta-amiloide 25-35; señalando que, dependiendo de la dosis, todas tienen un mayor o menor efecto neuroprotector y algunas también pueden presentar un efecto neurotóxico en dosis más altas.

## 2.2 Bases Teóricas

### 2.2.1 *Accidente Cerebro Vascular*

El ACV es un término clínico referido al rápido desarrollo de déficit neurológico focal que según su etiología puede ser isquémico, cuando es causado por la interrupción del flujo sanguíneo a causa de un coágulo, una burbuja de grasa o aire o vasoconstricción; es de tipo hemorrágico cuando hay un sangrado del parénquima cerebral o parénquima subaracnoideo (Grysiewicz et. al, 2008).

Los accidentes cerebrovasculares representan aproximadamente el 50% de las enfermedades neurológicas en adultos a nivel mundial (Ardilla & Roselli, 2007) anualmente alrededor de 17 millones de pacientes son atendidos por un accidente cerebrovascular, siendo causa de muerte de 6,5 millones y la primera causa de discapacidad a largo plazo (García Alfonso et al., 2019). Son múltiples los factores de riesgo del ACVi, entre los factores no modificables destacan que el riesgo se duplica cada década después de los 55 años, así también hay mayor incidencia en personas de raza negra, o cuando hay antecedentes familiares; en general hay mayor incidencia en varones, aunque en población joven es mayor en mujeres. Respecto a los factores de riesgo modificables se considera la dieta alta en sodio y baja potasio, la inactividad física y el uso de tabaco o alcohol son algunas causas que incrementan el riesgo, así también, enfermedades como obesidad, hipertensión o diabetes estarían relacionados (Grysiewicz et al., 2008).



En América Latina y el Caribe, el ACV es la principal causa de muerte, si bien en países como Brasil, México y Argentina se ha incrementado la inversión en investigación y en consecuencia lideran la producción científica en ACV, aún ningún país cuenta con un programa nacional que ayude a abordar esta problemática (Alarcon et. al, 2019). Entre ellos Perú, que según diversos investigadores reportan que no se cuenta con estudios epidemiológicos, prevalencia o incidencia, a nivel nacional; así mismo reportan una elevada cifra en el promedio de días de hospitalización, y una ausencia de registros sobre los pacientes después del alta, lo cual impide conocer las consecuencias a largo plazo (Castañeda. et al., 2011; Davalos & Málaga, 2014; (Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud e Investigación [IETSI], 2018).

El ACVi se da por la disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) que conlleva a daños por la falta de suministro de oxígeno y glucosa, según el tiempo y cantidad de este habrán áreas donde el daño es irreversible, como el centro isquémico donde el FSC es menor de 10 ml por minuto por cada 100 g de tejido; áreas que pueden progresar a un daño irreversible, como la zona de penumbra donde el FSC va entre 10 y 17 ml por minuto por cada 100 g de tejido; y áreas de recuperación espontánea donde el FSC es 17 ml por minuto por cada 100 g de tejido (García et al., 2019).

La interrupción de flujo sanguíneo, conlleva a la disminución en la producción de ATP, que conduce a cambios en las concentraciones de sodio, potasio y calcio. (García et al., 2019). En consecuencia las neuronas y las células gliales se despolarizan exageradamente por la entrada de sodio, cloro, calcio y agua al citoplasma; ocasionando un incremento de glutamato, que conduce a una hiperexcitación de los receptores NMDA ionotróficos y metabotróficos, y de los receptores AMPA, lo que confluencia en un incremento aun mayor de la concentración de calcio intracelular, originando la muerte



celular, un factor clave en los procesos que conducen al daño neuronal irreversible (Arango et al., 2004; Castillo, 2001).

Los tratamientos de ACVi en la prevención del desarrollo de complicaciones y buscando limitar la lesión originada, consiste en la restauración de la perfusión cerebral, sin embargo también se proponen otras estrategias que puedan proteger el sistema nervioso, haciendo uso de un agente que prevenga la muerte neuronal inhibiendo, ralentizando o deteniendo los procesos fisiopatológicos de una lesión del sistema nervioso o isquemia, dichos mecanismos son denominados “neuroprotección” (Moretti et al., 2015).

### ***2.2.2 Neuroprotección***

La neuroprotección en el ACVi hace referencia a la conservación del tejido comprometido por la isquemia, que de no ser tratado morirá, está directamente relacionado a la conservación del área de penumbra, buscando conservar células neuronales, astrocitos, pericitos y células endoteliales (Chamorro et al. 2020).

La neuroprotección ha sido ampliamente estudiada con uso de diversos agentes, teniendo resultados prometedores en estudios pre-clínicos, que sin embargo al llegar a fase clínica no han demostrado ser viables (Pellegrini-Giampietro et al., 2004). Algunos mecanismos de neuroprotección en el ACVi considera alternativas como inhibidores de la liberación de glutamato, antagonistas de canales de calcio voltaje –dependientes, antagonistas de los canales de NMDA, hiperpolarizantes de las membranas neuronales, antiinflamatorios, entre otros (Castillo, 2001).

El ácido glutámico o glutamato es el principal aminoácido excitador, el más abundante del sistema nervioso, calculándose que dos tercios de las neuronas de la corteza cerebral son glutamatérgicas. Es considerado neurotransmisor por localizarse en vesículas pre-sinápticas, ser expulsado de terminales axónicas ante la estimulación, y tener receptores



específicos, entre otros factores. Las neuronas glutamatérgicas extienden su acción a lo largo del eje encefalomedular y el sistema nervioso periférico, teniendo terminales que establecen gran proporción de contactos con espinas dendríticas. Es principalmente sintetizado a partir de glucosa y su función se ha relacionado a la síntesis de otras proteínas, otros neurotransmisores y también a funciones de memoria vinculadas a potenciación a largo plazo a nivel de sinapsis (Brailowsky, 2002; Medina & Escobar, 2002)

Al ser un neurotransmisor excitatorio abundante en el sistema nervioso, es potencialmente excitotóxico, parte de su homeostasis está regulada por el astrocito que recapta glutamato del espacio sináptico. La presencia de glutamato extracelular se ha relacionado con un efecto neurotóxico que induce pérdida neuronal, estando relacionado a patología como crisis convulsivas o accidentes isquémicos, en este sentido, algunos estudios han demostrado que el uso de antagonistas del receptor de glutamato puede proteger a las neuronas en estas patologías (Brailowsky, 2002)

En el ACVi se ha demostrado una relación entre la presencia de glutamato y el nivel de daño cerebral, encontrando que en regiones del área afectada la liberación de glutamato varía y se correlaciona positivamente con el volumen del infarto y la extensión de la disminución del flujo sanguíneo, por lo tanto, hay una liberación máxima de glutamato en el núcleo del infarto y disminuye hacia la periferia del área de penumbra (Pellegrini et al., 2004).

En consecuencia la regulación del glutamato sería relevante en procesos isquémicos, en este sentido Elphick & Egertová en el 2001 propusieron un modelo de regulación de neurotransmisores inhibitorios y excitatorios, donde la anandamida sintetizada por las células post-sinápticas viaja a la célula pre-sináptica para modular la liberación de neurotransmisores de los terminales pre-sinápticos en un proceso conocido



como supresión de la inhibición mediada por despolarización (DSI), denominado inhibición, cuando el neurotransmisor suprimido era ácido  $\alpha$ -amino butírico (GABA) responsable de sinapsis inhibitoria. Pero también se describió un mecanismo similar para la supresión de corrientes de glutamato (excitatorias) en un proceso conocido como supresión de la excitación mediada por despolarización (DSE) (Alger, 2012; Trattner et. al, 2013).

### **2.2.3 Sistema sensorio – motor**

Es un sistema de organización jerárquico que abarca el córtex asociativo (porción de neocorteza parietal), el córtex motor secundario (corteza parietal posterior y la corteza prefrontal dorsolateral), el córtex motor primario (giro pre-central del lóbulo frontal), los núcleos motores del tronco encefálico y los circuitos motores espinales, cada uno tiene sus propias estructuras neurales y realiza una función distinta y a la vez interconectada. Es un sistema paralelo al sensorial, la diferencia radica en que mientras los sistemas sensoriales procesan la información hacia arriba, el sistema sensoriomotor procesa la información principalmente hacia abajo (Pinel, 2001).

Se ha demostrado la existencia de mapas somatosensoriales a través de las especies, que son el mapeo topográfico del epitelio sensorial periférico y otros parámetros sensoriales. Se desarrollan a partir de una combinación de señales moleculares y dependiente de la actividad de los procesos, además se co-localizan con neuronas proximales con funciones similares. La mayor parte de estos mapas se encuentran en la superficie del córtex parietal, sin embargo, no mantienen la misma estructura y se ha observado que estos pueden cambiar en respuesta a la experiencia y a las lesiones (Harding-Forrester & Feldman, 2018).

Las consecuencias comunes de un ACVi causan lesiones en el sistema nervioso, afectando las funciones sensorio-motoras y de coordinación (Ruan & Yao, 2020). Entre las



mayores secuelas esta la parálisis de extremidades contralateral a la lesión, por lo que es importante evaluarlas y considerar su simetría con el lado opuesto (Yu et. al, 2018). Siendo que estos pacientes pueden presentar hemiparesia, monoparesia, temblores, entre otros síntomas sensorio-motores.

Así mismo, el sistema sensorio – motor está íntimamente vinculado a la adquisición de habilidades motoras, se sabe que el aprendizaje motor podría degradarse si la consolidación de la memoria motora es interferida. La corteza motora primaria (M1) juega un papel importante en el aprendizaje motor y su consolidación, sin embargo, algunos reportes señalan que lesiones en el córtex somatosensorial primario (S1) interfiere en toda la función sensoriomotora en primates no humanos e interfiere en la creación de nuevos aprendizajes motores (Wali, 2020).

#### ***2.2.4 Memoria espacial***

La memoria es una función cognitiva que permite fijar, conservar y evocar la información recibida del medio, la información obtenida consciente o inconscientemente, será codificada para ser almacenada y posteriormente recuperada para su uso (Mesa & Rodríguez, 2016). La recuperación de esta información puede darse de manera voluntaria o involuntaria, según este funcionamiento la memoria a largo plazo se divide en dos subsistemas: memoria declarativa (explícita) y memoria no declarativa (implícita), respectivamente. La memoria declarativa incluye la memoria episódica, que hace referencia a la fijación, mantenimiento y recuperación de experiencias asociadas a un espacio (memoria espacial) y tiempo (memoria temporal); también incluye la memoria semántica que procesa la información necesaria para el lenguaje (Portellano & García , 2014).La memoria no declarativa incluye: priming, habilidades y hábitos, aprendizaje asociativo



(condicionamiento clásico e instrumental) y aprendizaje no asociativo (habitación y sensibilización) (Carrillo, 2010).

**2.2.4.1 Psicobiología De La Memoria.** Los primeros estudios para identificar las bases fisiológicas de la memoria en humanos se desarrollaron con ayuda de pacientes con patologías a quienes se sometía a cirugías experimentales como tratamiento, es así que Milner y Scoville en 1957 reportan defectos de memoria generalizados en todos los pacientes cuyas extirpaciones incluyeron porciones del hipocampo e incluso señalan una correlación entre el grado de extirpación del hipocampo y la gravedad de la pérdida de memoria (Milner & Klein, 2015). Uno de los casos más estudiados por Milner fue el paciente H.M, a quien, para tratar la epilepsia, se le extirparon porciones mediales de ambos lóbulos temporales, posterior a lo cual presentó una severa amnesia retrograda y anterógrada, si bien respondía dentro de la media a los test de memoria a corto plazo posteriormente no recordaba su ejecución, otro aspecto interesante fue que lograba mejorar su desempeño al responder los test con menos errores que las primeras veces, pero él manifestaba ser la primera vez que ejecutaba la actividad, mostrando una memoria declarativa alterada y una memoria no declarativa conservada. De este modo, se identificó un problema específico en la memoria de consolidación para trasladar las memorias de corto plazo a largo plazo (Pinel, 2001).

El paciente H.M. presentó también alteraciones en la memoria espacial, reportan que aparecía perdido a más de dos bloques de su casa o iba a la casa donde se había mudado en vez de donde vivía, otro paciente con un daño similar, llamado D.C. no podía encontrar el camino al hospital donde había sido residente por 11 años. Esta desorientación espacial profunda se ha reportado en pacientes con amnesia y señalan que esta forma de



representación espacial estaría asignada al hipocampo y asumen que los pacientes con amnesia presentan una incapacidad de crear mapas cognitivos. (O'keefe & Nadel, 1978)

**2.2.4.2 Teoría De Los Mapas Cognitivos.** Edwar Tolman fue el primero en referir al constructo de “mapas cognitivos”, él realizó un experimento donde entreno ratas para resolver un laberinto y llegar del punto A al H, siguiendo la ruta BCDEFG, una vez obtenido su aprendizaje se les bloqueo la ruta C y se les dio 18 distintas alternativas para llegar punto H, encontrando que el 36 % de los animales tomo el camino directo a la meta y 17% escogió la ruta bloqueada. A partir de este experimento y de una revisión de trabajos semejantes señaló que si bien el aprendizaje inicial podría darse por estímulo-respuesta (E-R), en la acumulación en el sistema nervioso funcionan como “mapas cognitivos”, que son el mecanismo psicológico que permitiría generar un mapa del ambiente, y este mapa tentativo indica rutas y vínculos con el ambiente que determinarían la respuesta (Tolman, 1948). Esta línea de investigación fue profundizada a través de experimentos de electrofisiología en ratas, donde hallaron que en el hipocampo había neuronas específicas de lugar que serían la base biológica de los mapas cognitivos, permitiendo al individuo reconocer sus movimientos a través del espacio (O'keefe & Dostrovsky, 1971). En adelante Kaplan señalaría “el mapa cognitivo es un constructo que se ha propuesto para explicar cómo los individuos saben de su entorno, supone que las personas almacenan información sobre su entorno en una forma simplificada y en relación con otra información que ya conozcan, es como si un individuo llevara un mapa o modelo del medio ambiente en su cabeza” (O'keefe & Nadel, 1978, p.77).

De este modo, los mapas cognitivos nos permiten desenvolvemos en el ambiente a través de la creación del espacio psicológico, de forma que, si bien el espacio psicológico y el físico están relacionados, el espacio físico es el mundo exterior y el psicológico son



aquellas construcciones mentales abstraídas de la experiencia y las senso–percepciones del mundo exterior que son organizadas en un órgano sensorial especializado, es un espacio que no existiría sin la mente (O'keefe & Nadel, 1978). El almacenamiento de información sobre la ubicación física de objetos en el espacio hace referencia a la memoria espacial, y una respuesta conductual observable y medible que se basa en la memoria espacial es la navegación, conocida como la capacidad de viajar de un lugar a otro; y la estrategia utilizada para navegar puede ser egocéntrica o aloécéntrica, según sea a partir del uso de información organizada de señales internas o externas del individuo, respectivamente (Morellini, 2013).

Los estudios en animales, han sido útiles para comprender este proceso, puesto que los animales requieren la memoria de lugares para recordar cómo está distribuido su ambiente, y así desplazarse desde su madriguera a zonas potenciales fuentes de alimento o de agua o zonas de refugio, es así que uno de los experimentos que permitió reconocer esta habilidad espacial en animales fue de Olton y Samuelson en 1976, quienes usaron un laberinto radial de ocho brazos y colocaron alimento en cada brazo, observando el recorrido y considerando como error cuando los animales recorrían un brazo del que ya habían obtenido el alimento, los resultados mostraron que los animales no volvían a tomar caminos ya recorridos, pese a que se reponga la comida o incluso se manipule su olfato; por lo que concluyeron que los estímulos espaciales fueron la clave para encontrar un objeto en el ambiente (Domjan, 2010).

Para recordar la ubicación de objetos o encontrar el camino a través del ambiente requerimos de la memoria espacial, que es la habilidad de codificar, almacenar y recuperar información sobre ubicaciones espaciales, su configuración o rutas (Kessels et. al, 2001). La cognición espacial se obtiene a través de la exploración, un comportamiento instintivo y



conservado a través de las especies, donde interviene la memoria espacial, como la función encargada de reconocer, codificar, almacenar y recuperar información espacial sobre la disposición de objetos o rutas (Carrillo, 2009).

A partir de los estudios anteriormente descritos, se identifica que la memoria espacial es crucial para desplazarse a través del ambiente, para orientarse en referencia las experiencias pasadas y se reconoce que en el hipocampo hay células especializadas para llevar a cabo estas tareas.

### **2.2.5 *Aprendizaje espacial***

El aprendizaje es el proceso de adquisición de nueva información que produce cambios relativamente permanentes y permite adquirir habilidades, conocimientos y conductas (Redolar, 2014). Este proceso se da tanto de manera consciente como inconsciente y permite que los seres humanos y otros animales puedan adaptarse al medio, pues ambos tienen una predisposición al aprendizaje que permite responder a diversos eventos de distintas formas, entre ellos reconocer cómo funcionan las cosas y consecuentemente saber que esperar del ambiente, y al no suceder del modo esperado se da otro aprendizaje (Butler & MacManus, 2014).

El aprendizaje ha sido explicado por múltiples teorías, inicialmente fue la teoría conductista postulada por Watson, quien se enfoca en los cambios medibles del aprendizaje reconociendo su disminución, aumento o mantenimiento a través de la manipulación de variables, postulando que el comportamiento es moldeable por estrategias de condicionamiento. Considerando limitaciones en la teoría conductista, Bandura agrega que hay cambios de comportamiento por observación y postula la teoría cognitiva por aprendizaje observacional. Más tarde, Piaget considera que el desarrollo explica el aprendizaje y plantea la teoría constructivista, asemejando el desarrollo a una construcción,



señala que el aprendizaje es una compleja interacción entre la maduración del sistema nervioso, la experiencia, la interacción social, el equilibrio en el desarrollo mental y la afectividad (Kay & Kibble, 2016; Rodriguez, 1999).

Posteriormente, trabajos como los de Spence y Lippit, en el que se expuso a ratas sin hambre ni sed a un laberinto en “Y”, donde se les colocó comida en un brazo y agua en el otro, para posteriormente dividirlos en grupos de ratas con hambre y otro con sed; observaron que si bien las ratas no tomaron ni agua ni comida durante los entrenamientos, durante la prueba fueron al brazo correcto según la necesidad que tuviesen, lo que demostraba que los animales habían conservado la información del ambiente y podían manipularla según sus necesidades (Tolman, 1948). Este fue uno de los experimentos que llevaron a Tolman a postular los “mapas cognitivos” y la capacidad de los animales para aprender y memorizar la disposición espacial de un entorno y la posición de objetivos u objetos específicos dentro del mismo y su relación entre sí (Morellini, 2013).

**2.2.5.1 Psicobiología De Los Mapas Cognitivos.** Donal Hebb fue otro estudioso respecto a la comprensión del condicionamiento clásico, donde él postulaba que una neurona excitada tiende a disminuir su descarga frente a una neurona inactiva y tiende a incrementar su descarga ante una neurona activa, por ello con la repetición de esta tendencia formaban rutas neurales que según la repetición se hacían cada vez más sólidas (Hebb, 1949). Años más tarde, este constructo fue explorado en los trabajos de O’Keefe y Dostrovsky (1971), donde a partir de experimentos con electrofisiología, evidenciaron que cada vez que el animal se dirigía a un lugar específico un grupo de células hipocámpicas se activaba; denominándolas “*células de locación*”, posteriores estudios de Moser y Moser (2005) identificaron que este sistema neuronal constaba no solo con las denominadas “*células de locación*”, sino de múltiples células funcionalmente especializadas que se



activaban para la navegación llamándolas “*células en red*”, las cuales generan un sistema de coordenadas que permiten un posicionamiento y una búsqueda de rutas preciso. Estos dos últimos trabajos fueron galardonados con el premio nobel de medicina o fisiología del 2014 por su aporte al conocimiento de las células de posicionamiento en el cerebro (Tolman, 1948; O’Keefe & Dostrovsky, 1971; Milner, 2005; Schiller et. al, 2015; Moser et. al, 2017).

**2.2.5.2. Estrategias De Navegación.** El aprendizaje permite un cambio en la conducta a partir de la experiencia, para que exista una continuidad en este proceso es fundamental el trabajo de la memoria. Ambos procesos se complementan a nivel neuronal, en relación a procesos de neuroplasticidad, a nivel cognitivo, donde la memoria permitirá codificar, conservar y evocar la información que luego podrá ser utilizada en el aprendizaje; y a nivel conductual puesto que la información externa es la que es procesada e induce modificaciones en memoria y aprendizaje. Comprendiendo los procesos descritos anteriormente es posible afirmar que para aprender se necesita memorizar (Aguilar et. al, 2010).

El aprendizaje y la memoria espacial se relacionan con la capacidad de adquirir y retener asociaciones de las características del ambiente que le permiten al organismo desenvolverse en el espacio, un aspecto crucial para la supervivencia los seres vivos (Alvarado et. al, 2011). El desarrollo de la habilidad de transportarse a través del ambiente para satisfacer múltiples necesidades, sin perderse, requiere memorizar rutas y ubicaciones, esta es la habilidad de navegación espacial, para la cual puede utilizarse pistas distantes del ambiente para navegar (alocéntrica) o usando pistas internas como basadas en los propios movimientos (egocéntrica) (Vorhees & Williams, 2014). Para la resolución de tareas espaciales los roedores han mostrado formas de navegación por orientación, guía,



cartográfica y de integración de la ruta, las dos primeras más relacionadas a un aprendizaje por asociación de estímulos, en el aprendizaje cartográfico implica uso de señales distales con las que el animal forma una representación de su entorno (mapa cognitivo) y en la integración incluye el uso de las señales distales y señales internas de referencia; estas estrategias de navegación espacial parecen depender de algunos sistemas de memoria (Vicens et. al, 2003).

Uno de los modelos para explorar la memoria y aprendizaje espacial fue desarrollado por Morris en 1981, cuyo experimento consistía en colocar a la rata dentro de una piscina circular rellena de agua opaca de forma que no se viera la plataforma (zona segura) a la que podían escapar, el ambiente además contaba con señales distales con la intención de inducir el procesamiento espacial. Durante el entrenamiento se mantuvo el mismo punto de partida, sin embargo, el día de la prueba se las colocó en diferentes puntos de inicio, y se observó que las ratas podían llegar con éxito sin importar el punto de partida, concluyendo que habían formado un mapa espacial del ambiente y que las señales distales serían suficiente para promover una estrategia espacial (Domjam, 2001).

Posteriormente, Morris continuó el experimento realizando una comparación de 4 grupos, donde podrían escapar navegando a una plataforma colocada por encima o por debajo de la superficie del agua en una ubicación fija o variada según el grupo. De este modo los animales aprendieron a encontrar la plataforma rápidamente, excepto con el grupo que tuvo la plataforma oculta con posición variada, además presentaron una direccionalidad para llegar a meta. Las siguientes fueron pruebas de transferencia en la que se movió o eliminó la plataforma, el grupo entrenado con un lugar fijo presentó un fuerte sesgo espacial para la primera posición y mostraron latencias más cortas para aprender la nueva ubicación. Los resultados apoyaron la noción de que la localización distal es



suficiente para promover la estrategia de búsqueda espacial en ratas entrenadas. (Kapadia et. al, 2016).

Carol Barnes (1979) también estudió la habilidad de aprendizaje espacial y sus cambios por el envejecimiento, para lo cual realizó un experimento con ratas jóvenes y seniles a quienes expuso a una plataforma circular y utilizó la tendencia de los roedores a evitar las superficies abiertas y muy iluminadas, de forma que estas buscaran un espacio cerrado y oscuro, promoviendo así la búsqueda de un lugar en particular (zona segura). Basándose en los trabajos de mapas cognitivos supuso que las ratas en una situación de laberinto circular tendrían aprendizaje espacial, posteriormente ella demostró esta suposición encontrando una curva de aprendizaje que presentaba latencias cada vez más cortas para encontrar la zona segura en el transcurrir de los días.

### ***2.2.6 Hipocampo***

Es una lámina curvada de corteza que está plegada en la superficie media y basal del lóbulo temporal, consta de tres partes mayores: el giro o circunvolución dentada, el subículo y el hipocampo propiamente dicho. Desde el punto de vista fisiológico ha sido dividido en tres regiones, en sentido lateral medial: Cuernos de Amon (CA1, CA2 y CA3) (Aguirre, 2015). Esta estructura ha sido observada en múltiples animales, por lo que se considera homologa a través de las especies. En conjunto, estas estructuras están encargadas de la formación de memorias a largo plazo de la experiencia diaria, denominadas memorias episódicas, el daño del hipocampo interfiere con la capacidad de creación de nuevas memorias, sin embargo, no impide acceder a las memorias anteriores (Kandel et. al, 2013)

Las funciones del hipocampo están asociadas con funciones cognitivas, particularmente con el aprendizaje y la memoria (Seo et al., 2014). En concordancia,



estudios realizados con ratas sometidas a lesiones temporales mediales, muestran que el proceso de adquisición, retención y recuperación de la memoria declarativa están deteriorados al momento del aprendizaje, por consiguiente, el hipocampo y el giro dentado son necesarios para codificar y consolidar los recuerdos de acontecimientos y objetos en un tiempo determinado (Portellano & García, 2014). Solís & López (2009) refieren que el hipocampo juega un papel crítico en la creación de nuevos recuerdos, así como en el procesamiento de memoria declarativa y espacial.

### 2.2.7 *Lepidium meyenii* (maca)

La maca (*Lepidium meyenii*) es una planta que se encuentra en la región de los andes centrales del Perú, pertenece a la familia Brassicaceae, cultivada a grandes altitudes (4000 - 4500 metros) en tierras caracterizadas por ser rocosas, pobres y estériles, con presencia de espacios soleados, fuertes vientos y bajas temperaturas. Durante años ha sido conocida por la población por sus propiedades energéticas, en la mejora del aprendizaje y en beneficio del sistema reproductivo, sin embargo, este conocimiento ha sido corroborado por la ciencia durante las últimas décadas, evidenciando propiedades antioxidantes, energizantes, mejora la tasa de crecimiento, el deseo sexual e incrementa el volumen seminal (Gonzales, 2012; Sifuentes et. al, 2015).

La maca está compuesta por proteínas, lípidos, carbohidratos, fibras, minerales y cenizas; así mismo posee ácidos grasos insaturados y ácidos grasos poliinsaturados (macaenos y macamidas), que son consideradas marcadores químicos porque no han sido encontrados en otra especie de *Lepidium*. Las macamidas pertenecen al grupo de metabolitos secundarios encontrados en la raíz de la maca, siendo estos ácidos grasos saturados e insaturados los que han demostrado tener un posible efecto neuroprotector por inhibición de la FAAH (Sifuentes et al., 2015)



Otras propiedades de la maca están relacionadas a su posible efecto neuroprotector, a partir de estudios *in vitro* en neuronas de cangrejo sometidas a estrés oxidativo e *in vivo* en ratas inducidas a isquemia cerebral focal, donde fueron tratadas con extracto pentánico de maca; se encontró una preservación del tejido. En el estudio *in vitro* había una mayor conservación en dosis más altas, sin embargo, en el modelo *in vivo* las dosis de 0.3 mg/ kg redujo el tamaño del infarto, mientras que las dosis de 10 mg/kg y 30mg/kg incrementaron el tamaño del infarto, ambos modelos confirman el posible efecto neuroprotector del extracto pentánico de maca (Pino-Figueroa et al., 2010).

Estudios posteriores identificaron los mecanismos relacionados a este efecto neuroprotector, señalando que las macamidas tienen un efecto inhibitorio en la amida hidrolasa de ácido graso (FAAH), enzima responsable de la degradación endocannabinoide en el sistema nervioso (Vu, 2012). Posteriormente Wu y colaboradores en el 2013 analizaron 11 de las 19 macamidas sintetizadas, señalando que 5 tienen un potente efecto inhibitorio en FAAH, y que estas son derivadas de ácidos oleicos, linoléicos, linolénicos y benzilamina o 3 methoxibenzilamina. Así mismo, Almukadi y colaboradores (2013) refieren que la macamida N-3-methoxibenzil – linoleamida es un inhibidor tiempo dependiente mixto y con mecanismo no competitivo, sugiriéndola como un potencial analgésico, anti inflamatorio y neuroprotector. En 2018, caracterizaron el efecto inhibitorio de 4 macamidas sobre la actividad de FAAH, refiriendo que N-Bencil-(9Z,12Z)-octadecadienamida presenta el mayor efecto inhibidor en FAAH, función relacionada a la cantidad de enlaces dobles de esta macamida, añadiendo que las macamidas con dobles enlaces tendrán una mayor inhibición de FAAH y este sería dependiente de la concentración (Alasmari et. al, 2019).



A partir de los estudios anteriores, se sugiere el uso de macamidas aisladas como inhibidores de la principal enzima sintetizadora de endocannabinoides en el sistema nervioso, enzima del ácido graso amida hidrolasa (FAAH por sus siglas en inglés “fatty acid amide hydrolase”). También se ha demostrado que el sistema endocannabinoide está involucrado en la neuroprotección, así como en efectos inflamatorios, antioxidantes y analgésicos (Almukadi et al., 2013).

### **2.2.8 Sistema endocannabinoide**

El sistema endocannabinoide está compuesto por dos receptores cannabinoides acoplados a proteína G identificados como CB1 y CB2 (Grotenhermen, 2006) y por ligandos endógenos que son derivados de ácidos grasos, que se acoplan a dichos receptores. El receptor CB1 está mayormente expresado en los sistemas nervioso y reproductivo, mientras que el receptor CB2 se encuentra principalmente en células del sistema inmune (Alarcón, 2016).

Este sistema contiene ligandos endógenos o endocannabinoides identificados como anandamida o araquidoniletanolamina (AEA) y 2-araquidonoilglicerol (2-AG). Son degradados por enzimas hidrolasas, AEA se degrada de la amida hidrolasa de ácido graso (FAAH), mientras que 2-AG se degrada de FAAH y monoacilglicerol lipasa (MAGL). Entre algunas características de estos ligandos esta su liberación retrógrada y a demanda, puesto que son liberados de la neurona post – sináptica a la pre-sináptica, solo son sintetizados y liberados en respuesta al aumento del calcio intracelular (Pertwee, 2015).

Así también, los endocannabinoides regulan retrógradamente la neurotransmisión sináptica, modulando neurotransmisores como el glutamato y el ácido gammaaminobutírico (GABA). Después de ser sintetizados, los endocannabinoides son liberados por terminales postsinápticas, viajan por la hendidura sináptica para unirse y activar los receptores



cannabinoides (CBR) en la membrana presináptica, donde se activará una cascada metabólica que inhibirá la liberación de neurotransmisores. Dependiendo de si la transmisión es de GABA o glutamato, dicha inhibición presináptica de la liberación de neurotransmisores por endocannabinoides puede conducir a dos formas diferentes de plasticidad sináptica, la activación de CBR en terminales axónicos de neuronas gabaérgicas media la supresión de inhibición inducida por despolarización (DSI), mientras que la activación de CBR en los terminales axónicos de las neuronas glutamatérgicas media la supresión de la excitación inducida por despolarización (DSE). Esta señalización está ampliamente distribuida por todo el sistema nervioso central (Alger, 2012; Scherma et al., 2019; Trattner et al., 2013).

Se ha demostrado que el sistema endocannabinoide está involucrado en la neuroprotección, así como en efectos inflamatorios, antioxidantes y analgésicos (Almukadi et al., 2013). Diversas investigaciones han mostrado un incremento de expresión de receptores de CB1 y CB2 durante la isquemia, encontrando que la inhibición de la activación del receptor CB1 es protectora mientras, la inhibición de la activación del receptor CB2 incrementa el daño (Zhang et al., 2008).

## **2.3 Hipótesis**

### **2.3.1 *Hipótesis general***

Las macamidas sintéticas pueden ejercer efecto neuroprotector en la reducción del área de infarto, la conservación de la respuesta sensorio-motora y alivio del deterioro de memoria y aprendizaje espacial causados por isquemia cerebral focal en ratas.



### 2.3.2 *Hipótesis específicas*

- Las macamidas sintéticas pueden ejercer efecto neuroprotector en la reducción del área de infarto en un modelo animal experimental de isquemia cerebral focal.
- Las macamidas sintéticas pueden ejercer efecto neuroprotector a través de la conservación de la respuesta sensorio-motora en un modelo animal experimental de isquemia cerebral focal.
- Las macamidas sintéticas pueden ejercer efecto neuroprotector a través de la preservación de memoria espacial en un modelo animal experimental de isquemia cerebral focal.
- Las macamidas sintéticas pueden ejercer efecto neuroprotector a través de la preservación de aprendizaje espacial en un modelo animal experimental de isquemia cerebral focal.

## 2.4 Variables

### 2.4.1 *Identificación de variables*

- Variable Independiente (VI): macamidas semi- sintéticas
- Variable Dependiente (VD): efecto neuroprotector



### 2.4.2 Operacionalización de variables

**Tabla 1**

*Operacionalización de variables*

VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA	VALORES	
INDEPENDIENTE	Macamida sintética (MCH1)	Son ácidos grasos saturados e insaturados que han demostrado tener un posible efecto neuroprotector por inhibición de la FAAH.		Aplicación de las macamidas sintéticas, dosis: 3mg/kg IP, 30 min pre-MCAO y tratamiento un día post -MCAO por 10 días	Nominal	- Grupo SHAM - Grupo ACV tto VEH. - Grupo ACV tto MCH1.
DEPENDIENTE	Efecto neuroprotector	Hace referencia a cualquier estrategia con el objetivo de proteger el sistema nervioso, haciendo uso de un agente que previene la muerte neuronal inhibiendo, ralentizando o deteniendo los procesos fisiopatológicos de una lesión del sistema nervioso o isquemia.	Volumen de infarto	Superficie de tejido necrosado medido en mm <sup>3</sup> .	Proporción	Porcentaje
			Respuesta sensorio - motora	Latencia de respuesta Frecuencia de errores Puntuación por escala Simetría	Intervalo	Puntaje - Tiempo
			Memoria espacial y aprendizaje	Tiempo que demora en encontrar el lugar seguro.	Intervalo	Tiempo



## 2.5 Definición de Términos Básicos

- Accidente cerebro vascular: afección neurológica focal o general de aparición súbita y de presunto origen vascular, que perdura más de 24 horas o causa la muerte (OMS, 2005).
- Isquemia: interrupción del flujo sanguíneo a causa de un coágulo, una burbuja de grasa o aire o vasoconstricción (Grysiewicz et al., 2008).
- Neuroprotección: conservación del tejido comprometido por la isquemia, que de no ser tratado morirá. Busca conservar células neuronales, astrocitos, pericitos y células endoteliales (Chamorro et al., 2020).
- Macamidas: grupo de metabolitos secundarios presentes en la raíz de *Lepidium meyenii* (maca), son ácidos grasos poliinsaturados únicamente encontrados en esta especie de *Lepidium* (Sifuentes et al., 2015).
- Memoria espacial: habilidad de codificar, almacenar y recuperar información sobre ubicaciones espaciales, su configuración o rutas. (Kessels et. al, 2001).
- Aprendizaje espacial: es la capacidad de adquirir y retener asociaciones de las características del ambiente que permite al organismo desenvolverse en el espacio (Alvarado et. al, 2011)
- Anandamida: o araquidoniletanolamina (AEA), es un ligando endógeno del sistema endocannabinoide (Pertwee, 2015).



### Capítulo III: Método

#### 3.1 Alcance del Estudio

La presente investigación es de alcance explicativo, puesto que busco explicar la ocurrencia de un fenómeno por medio del empleo de métodos y diseños válidos y rigurosos; además estos estudios requieren el planteamiento explícito de hipótesis que permitan explicar tentativamente la ocurrencia de un fenómeno (Hernández et. al, 2014; Sánchez & Reyes, 2015). En este caso se pretendió explicar potencial efecto neuroprotector de la macamida sintética en la reducción del área de infarto, la conservación de la respuesta sensorio-motora y alivio del deterioro de memoria y aprendizaje espacial causados por isquemia cerebral focal en ratas.

#### 3.2 Diseño de Investigación

La presente investigación es de tipo experimental, con diseño experimental puro (Hernández et al., 2014; Sánchez & Reyes, 2015), puesto que se manipulo la variable independiente en tres grupos experimentales, representados a continuación:

$AG_{SHAM}$	$0_{SHAM}$	$X$	$0, 1_{SHAM}$
$AG_{V-ACV}$	$0_{V-ACV}$	$X_V$	$0, 1_{V-ACV}$
$AG_{M-ACV}$	$0_{M-ACV}$	$X_M$	$0, 1_{M-ACV}$

Donde:

**G:** Grupos Experimentales

**A:** Aleatorio

**G<sub>SHAM</sub>:** Grupo sham sin acv y tratamiento con suero fisiológico.

**G<sub>V-ACV</sub>:** Grupo ACV con tratamiento de vehículo

**G<sub>M-ACV</sub>:** Grupo ACV con tratamiento de macamida sintética

**X:** suero fisiológico al 9%



**X<sub>v</sub>**: Tratamiento vehículo por 10 días.

**X<sub>M</sub>**: Tratamiento con macamida sintética 3mg/kg por 10 días.

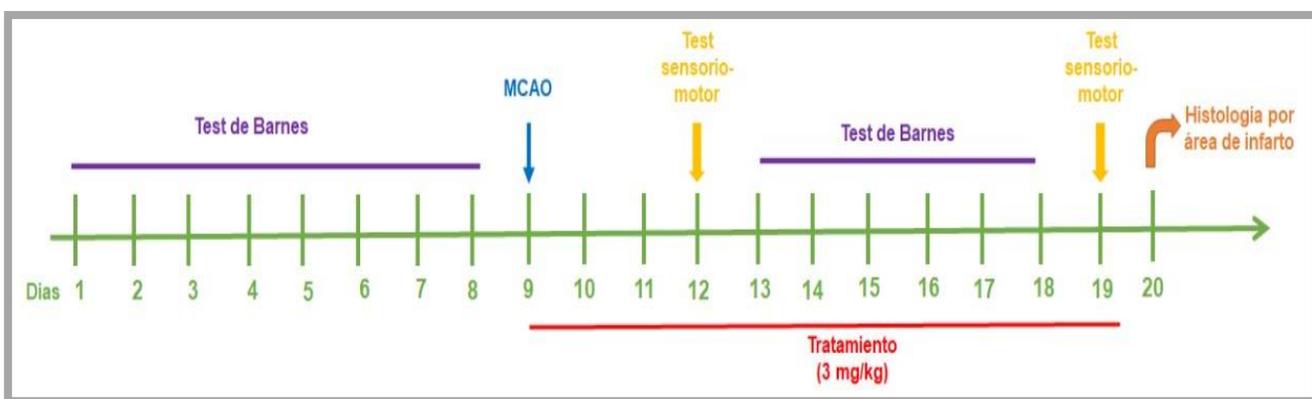
**0**: Test de Barnes

**1**: Evaluación sensorio-motora

Este será ejecutado como se muestra en la figura a continuación:

**Figura 1**

*Diseño experimental*



### 3.3 Sujetos

Se utilizó ratas machos *Sprague Dawley* con pesos de 280 a 310g y con una edad de 2 a 3 meses, provenientes del Bioterio de la Universidad Andina del Cusco, donde fueron alojados 4 animales por caja, a una temperatura de 24°C, con humedad del 34%, teniendo ciclos de luz – oscuridad de 12 horas, con alimento y agua *ad libitum*.

### 3.4 Muestra

El tamaño de la muestra fue calculado mediante el método de análisis de poder, considerando los parámetros de: tamaño de efecto (alto), error tipo I (considerando el nivel de significancia al 5% ( $p=0,05$ ), poder del estudio (95%). El cálculo de tamaño de la muestra para cada experimento fue realizado con ayuda del software G\*Power3.1.9.7.



A continuación, se detalla el cálculo de la muestra de los grupos experimentales. El test estadístico utilizado fue ANOVA de 1 vía para variables independientes de un factor (ratas machos), en 3 grupos de estudio establecidos para el tratamiento seguido de isquemia. Así, se obtuvo una estimación mínima de 11 animales por grupo y se trabajó con 35 animales de la cepa *Sprague dawley* con pesos de 280 g a 310 g para todo el proyecto. A continuación, se detalla el análisis del tamaño de muestra y poder de análisis para volumen de infarto para cuatro grupos de tratamiento en 2 set de tiempos de análisis:

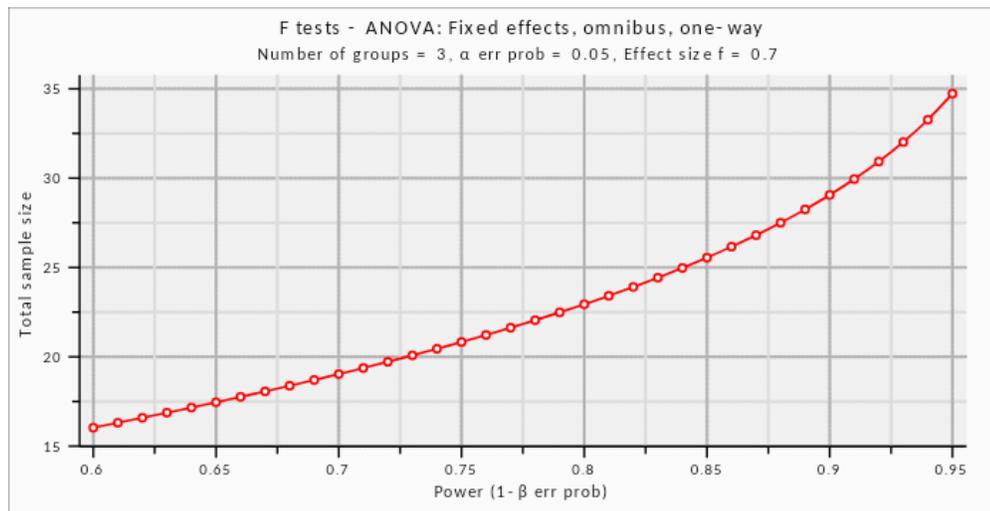
**Tabla 2**

*Análisis del tamaño de muestra*

F tests - ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way		
Analysis: A priori: Compute required sample size		
	Effect size f	0.70
	$\alpha$ err prob	0.05
INPUT	Power (1- $\beta$ err prob)	0.95
	Number of groups	3
	Noncentrality parameter	$\lambda=17.6400000$
	Critical F	3.28849177
	Numerator df	2
OUTPUT	Denominator df	33
	Total, sample size	36
	Actual power	0.9574624

**Figura 2**

*Análisis del tamaño de muestra*



### 3.5 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

#### 3.5.1. *Procedimiento quirúrgico por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)*

Se utilizó el modelo de oclusión filar de la arteria cerebral media seguido de la reperfusión, descrito por Koizumi (1986) y modificado por Longa (1989), realizando el procedimiento descrito a continuación:

1. Se anestesió a las ratas con Ketamina-xilasina (60 mg/kg-7 mg/kg de peso, su temperatura fue monitoreada y mantenida a 37 °C con el soporte de una manta térmica para iniciar el procedimiento quirúrgico.
2. Se posicionó al animal de cubito dorsal, dejando visible y limpia la zona de cuello para realizar una incisión longitudinal en la línea media de la arteria carótida común (ACC).
3. Se prosiguió con la separación del músculo digástrico y esternocleidomastoideo hasta dejar visible la ACC y separarla cuidadosamente del nervio vago. Dejando



expuesta la ACC y sus bifurcaciones: la arteria carótida externa (ACE) y la arteria carótida interna (ACI).

4. Seguidamente se interrumpió el flujo sanguíneo de la zona inferior de la ACC y del inicio de su bifurcación entre la ACE y la ACI.
5. Inmediatamente después se bloqueó temporalmente la ACI.
6. Se realizó una incisión a nivel de la ACC para la introducir el filamento de oclusión, mono nylon 4,0 con 17 a 20 mm de longitud, en dirección retrógrada a la ACE, progresando hasta la arteria cerebral media (ACM).
7. Se dejó al animal anestesiado y monitoreado por el tiempo de oclusión.
8. Pasado el tiempo de oclusión, se inició la reperfusión, se retiró el filamento introducido y se bloqueó la ACC sobre la incisión realizada para evitar sangrado, mientras que el bloqueo de la ACE fue liberado restaurando el flujo sanguíneo.
9. En este punto, el animal fue suturado y devuelto su caja para recuperación.

### **3.5.2. *Tratamiento con macamida sintética***

El tratamiento fue efectuado con la macamida sintética N-9Z, 12Z bencyloctadeca – dienamide (MCH1). Fue administrada 50 mg de la MCH1 diluida en una solución conteniendo 0.5 mL de polietilenglicol 600 (PEG 600) y 0.5 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener una concentración final de 50 mg/mL. Esta solución concentrada fue diluida en solución salina al 0.9% a una concentración de 2 mg/mL para obtener una dosis de 3 mg/kg, la cual fue administrada vía intraperitoneal (IP). La primera administración fue realizada 30 minutos previos a la inducción del ACVi. Al día siguiente se inició la aplicación de MCH1 a dosis de 3mg/kg, por vía IP, a cada 24 horas por 10 días. La



solución de MCH1 preparada el mismo día de la administración y fue mantenida a una temperatura de 50°C hasta antes de su administración.

### 3.5.3. Evaluación sensoria – motora

Para la evaluación sensorio-motora se utilizaron las tres pruebas descritas a continuación:

**a. Escala neurológica de García modificada.** Diseñada por García (1995) para evaluar la función motora, sensitiva y los comportamientos exploratorios en modelos animales de MCAO (García, et. al,1995), modificada más por tarde por Yeh, Tang, Tsai, Jeng y Hsieh (2018) obteniendo mayor fiabilidad y predictibilidad. Esta prueba cuenta con siete evaluaciones que fueron puntuadas de 0 a 3 como se describe en la **Tabla 3**. Para su ejecución se requiere una caja de campo abierto de 50 por 50 cm con paredes transparentes, una malla de 25 por 35 cm, con 2.5 por 2.5cm de ancho entre celdas y un instrumento para estimular la respuesta sensorial.

**Tabla 3**

*Evaluación neurológica de García modificada*

PRUEBAS	DESCRIPCIÓN	3	2	1	0
<b>Actividad espontánea</b>	Observación de la habilidad de aproximarse a los bordes superiores de las 4 paredes de la caja durante 5 minutos.	El animal se mueve y aproxima a los 4 lados de la caja.	El animal se mueve, pero no se aproxima los 4 lados de la caja.	El animal no se levanta y raramente se mueve	No presenta ningún movimiento.
<b>Movimiento simétrico de las 4 patas</b>	Sostener a la rata por la cola para observar la simetría de movimiento de sus 4 patas.	Las 4 patas se entienden con simetría.	Lado izquierdo con se extiende menos o más lento que el otro lado.	La pata delantera izquierda presenta el mínimo movimiento.	La pata delantera izquierda no presenta movimiento.



PRUEBAS	DESCRIPCIÓN	3	2	1	0
<b>Estiramien to de las patas delanteras</b>	Caminata con las patas delanteras mientras es sostenida por la cola.	Ambas patas están extendidas y tiene una caminata simétrica.	El lado izquierdo con se extiende menos o hay desviación al caminar.	El lado izquierdo presenta el mínimo movimiento.	El lado izquierdo no presenta movimiento.
<b>Escalada y presión</b>	Observación en 3 intentos para que el animal alcance la cima de la malla escalando simétricamente con ambas patas.	Alcanza la cima en los 3 intentos con una escalada simétrica.	Alcanza la cima 2 o 1 vez usando la muñeca en vez de la mano, inclinando el tronco o con escalada asimétrica.	Falla en escalar hacia la cima o tiende a caminar en círculos en vez de escalar.	
<b>Sensibilida d corpórea</b>	Observación de la respuesta propioceptiva al estímulo.	Gira la cabeza hacia el estímulo y reacciona igual a cada lado.	Reacciona lento hacia el lado izquierdo.	No responde hacia el lado izquierdo.	
<b>Respuesta al toque de bigotes</b>	Observación de la reacción al toque de cada lado de los bigotes con un objeto delgado.	Respuesta simétrica al girar la cabeza hacia el estímulo o respuesta sorpresiva.	Respuesta lenta del lado izquierdo.	No responde hacia el lado izquierdo.	
<b>Caminata en círculos</b>	Observación de la caminata en círculos espontánea en un campo abierto.	No presenta caminata en círculos.	Presenta caminata en círculos.	El animal se levanta o camina.	

Nota: Adaptada y traducida de Yeh, Tang, Tsai, Jeng, Chen & Hsieh, 2018.

**b. Prueba de retirada de cintas adhesivas.** Descrita por primera vez en 1982 por Schallert, Upchurch, Lobaugh y Farrar, es una prueba de estimulación táctil bilateral en ratas diseñada para detectar la respuesta sensorio-motora y su simetría. Para cuantificar dichos parámetros fue medida la latencia, considerando el tiempo que demora la rata desde el inicio de la prueba hasta detectar la cinta (sensibilidad) y el tiempo hasta retirarla



(motricidad), referido como tiempo de latencia (Schallert, Upchurch, Lobaugh y Farrar, 1982, Ruan & Yao, 2020).

Para el desarrollo de la prueba se colocó al animal en una caja transparente después de colocar dos cintas adhesivas del mismo tamaño en las partes sin pelo de cada pata delantera. Las cintas fueron aplicadas con la misma presión en cada extremidad. Cada prueba tuvo una duración de 180 segundos y se midió la latencia para detectar la cinta en cada pata (contralateral – ipsilateral), y la latencia para retirar la cinta de cada pata (contralateral – ipsilateral). Esta evaluación fue realizada con 3 días de pre-entrenamiento antes de la cirugía, con 3 ensayos por día, para que las ratas se familiaricen con la evaluación. La evaluación fue repetida al tercer y décimo día posterior a la inducción del ACVi (Zarruk et. al, 2011).

**c. Prueba de caminata en malla.** Descrita por primera vez por Hernández y Schallert en 1988, una prueba que mide la función sensoriomotora, coordinación motora y déficit durante la locomoción. Esta prueba nos permite detectar el daño motor posterior a un daño cerebral en modelos animales, para lo cual se requiere un periodo de entrenamiento previo y posterior a la inducción del ACVi (Hernández & Schallert, 1988; Zarruk et. al, 2011). Esta prueba fue realizada con pre-entrenamiento 2 días previos a la oclusión y fue continuada el tercer y décimo día post ACVi.

Consistió en colocar al animal en una malla con rendijas de 2.5 x 2.5cm, elevada y abierta de 60 x 40cm, con una pendiente de entre 20° y 40°. Sobre esta malla inclinada el animal fue colocado para que camine en un tiempo de 180 segundos. Para cuantificar el funcionamiento motor fue realizado un conteo del número errores o de veces que el animal deslizó una pata entre la rejilla abierta de la malla. El número de errores del lado ipsilateral



y contralateral fueron comparados, para ello se colocó una cámara de video por debajo de la superficie (Chao et. al, 2012; Schhar et. al, 2010).

#### **3.5.4. *Laberinto de Barnes***

El laberinto de Barnes fue descrito por primera vez en 1979 por Carol Barnes, con el objetivo de evaluar memoria y aprendizaje espacial en ratones o ratas. Consiste en una plataforma circular de 1.22 metros de diámetro con una elevación a un metro de altura. Su diseño generalmente varía según la cantidad de agujeros de la periferia (12 y 20 agujeros) conteniendo debajo del sistema una caja de escape (Rosenfeld y Ferguson, 2014).

La evaluación fue realizada en un ambiente de aproximado de 20m<sup>2</sup>, donde el experimentador se posicionó a una distancia de al menos 122cm del laberinto. La sala de experimentación fue preparada colocando pistas visuales en las paredes a 15cm de la altura de la plataforma, y una videocámara fue colocada a 1 metro y medio sobre la plataforma para la recolección de datos. Asimismo, fueron colocados estresores de luz (500 w) y sonido (90db) sobre la plataforma (Gawel et al.,2018)

Al inicio de cada prueba se realizó monitoreo de la temperatura y humedad de la sala, así como el control de los sonido y ventilación del ambiente. Así mismo, luego de cada ensayo, el laberinto fue limpiado usando etanol al 70% para controlar las pistas olfatorias.

Se diseñó un protocolo según los objetivos del estudio, donde se realizó una evaluación pre y post tratamiento siguiendo el protocolo descrito en la Tabla 4. Las etapas de habituación al sistema, entrenamiento de adquisición y día de prueba se realizaron previo a la MCAO y 5 días después de la misma, el día 6 se inició el entrenamiento reverso y posteriormente la prueba de aprendizaje reverso. Antes de iniciar el protocolo se dieron dos días de adaptación a la sala de 2 horas cada uno.



**Tabla 4**

*Protocolo de prueba del laberinto de Barnes*

ETAPA - DÍAS	DESCRIPCIÓN	ESTRATEGIA	PUNTUACIÓN
<b>Habitua- ción - día 3.</b>	1. Añadir el túnel de escape a la plataforma y bloquear los otros, además añadir la pista visual que permanecerá todas las fases.	Cada prueba realizada es clasificada como:	Los parámetros a evaluar son:
	2. Ubicar la rata en el centro de la plataforma y permitirle explorar durante hasta que ingrese al túnel de escape o 1 minuto.	<u>Espacial</u> : ir directo al túnel de escape con 3 o menos errores, incluyendo errores primarios.	1. <b>LATENCIA</b> : tiempo hasta ubicar el túnel de escape.
<b>Entrenam- iento de adquisició- n previa- día 4 al 7.</b>	3. Se le permite estar en el túnel de escape por 2 minutos.		2. <b>ERROR</b> : comprobar cualquier agujero que no sea el túnel de escape.
	4. Limpiar la plataforma y el túnel de escape con etanol al 70%.  *Solo se realiza una vez al día.	<u>Serial</u> : pasa la mayor parte del tiempo en la periferia, haciendo búsquedas sistemáticas en sentido de las agujas del reloj o contrarios hasta localizar el túnel de escape.	<u>Errores primarios</u> : número de agujeros incorrectos probados antes de ubicar el túnel de escape.
	1. Añadir el túnel de escape a la plataforma en una locación diferente a la de la prueba anterior.		3. <b>TIEMPO ACUMULADO</b> : Es el tiempo que la rata permanece en la zona donde anteriormente se encontraba el túnel de escape, se considera el agujero de escape y los dos adyacentes a este.
	2. El entrenamiento consiste en una prueba diaria de búsqueda del túnel de escape, hasta que lo logre o durante 3 min.		
	3. Se coloca a la rata en el centro de la plataforma, cubierta por una caja de plástico gris. Después de 15 segundos se retira la caja y se permite explorar el laberinto mientras se agrega estímulos de alta intensidad (luz, sonido) que induzcan la conducta de escape. Si pasado el tiempo el animal no ingreso a la caja de escape, se coloca a la por 30 segundos antes de retirarla.		
	4. Limpiar la plataforma y el túnel de escape con etanol al 70%.  *Se repite el entrenamiento tres veces al día.	<u>Aleatoria</u> : cruzar el centro del laberinto múltiples veces verificando varios agujeros, incluye los ingresos fallidos al túnel de	
	1. 24 horas después del 4to día de entrenamiento de adquisición se realiza una prueba de 90 segundos bloqueando el túnel de escape.		



ETAPA - DÍAS	DESCRIPCIÓN	ESTRATEGIA	PUNTUACIÓN
<b>Prueba – día 8 y 13</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Se administra de modo similar a las pruebas de adquisición, colocando a la rata en el centro de la plataforma para iniciar la prueba.</li> <li>Se graba la latencia primaria, errores y tiempo acumulado en la zona correcta (donde anteriormente estaba el túnel de escape y los dos agujeros adyacentes).</li> </ol> <p>* Esta prueba solo se realiza una vez al día.</p>	escape dentro de los 3 minutos.	
<b>Entrenam iento de aprendiza je reverso – día 14 - 17</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>Se cambia la locación de la zona del túnel de escape, entre 100° - 180° de donde estaba anteriormente.</li> <li>El entrenamiento consiste en la búsqueda del túnel de escape hasta ingresar o durante 3 min.</li> <li>Se repite el proceso del entrenamiento de adquisición.</li> </ol> <p>*Se realiza tres veces al día.</p>		
<b>Prueba de aprendiza je reverso – día 18</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>24 horas después del entrenamiento, se realiza una única prueba de 90 segundos bloqueando el túnel de escape.</li> <li>Se coloca a la rata en el centro de la plataforma para iniciar la prueba.</li> <li>Se graba la latencia primaria, errores y tiempo acumulado en la zona correcta (donde anteriormente estaba el túnel de escape y los dos agujeros adyacentes).</li> </ol>		

Nota: Traducido y adaptado de Pitts, 2018; Rosenfeld & Ferguson, 2014; Gawel, et.al. 2018

### 3.5.5. *Evaluación de daño morfológico*

Después de 10 días de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas con el fin de hacer coloración *in vitro* de sus encéfalos con 2,3,5 - cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) al 1% y medir el daño cerebral producido por la isquemia. Para este propósito los animales fueron anestesiados con dosis letal anestésico/analgésico Ketamina/Xilazina (KET-A-XYL),



posteriormente decapitados con guillotina y los encéfalos fueron cuidadosamente extraídos y colocados en una matriz cerebral donde se procedió a realizar cortes coronales de 2mm. Estos cortes fueron incubados en TTC durante 25 minutos a 37 °C, con protección a la luz y seguidamente fueron fijados por inmersión en solución de paraformaldehído 4% tamponada con PBS (pH 7,4). Finalmente, los cortes teñidos fueron fotografiados para analizar el volumen de infarto con apoyo del programa Fiji (Schindelin et al, 2012). Los cortes coronales fueron analizados siguiendo una secuencia rostral – caudal, cada corte fue medido en su cara anterior y posterior para identificar la mayor área de infarto representativa a ese corte. La medición del área para cada corte fue realizada tres veces, el valor final representa el promedio. El volumen de infarto de cada sección fue hallado dividiendo el área de infarto sobre el total de área del corte, multiplicado por el espesor del corte (2 mm). El porcentaje de volumen de infarto es el valor anterior multiplicado por cien. El porcentaje del volumen de infarto de cada animal fue:

$$\frac{\sum \text{volumen de infarto de 7 cortes}}{\sum \text{volumen total de 7 cortes}} \times 100$$

### 3.6 Validez y Confiabilidad de Instrumentos

Este proyecto utilizó el software Etho Vision XT15 para análisis de comportamiento del test de Barnes, el cual presenta resultados con un nivel de significancia menor al 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3.7 Plan de Análisis de Datos

Para el análisis estadístico se utilizó el software GraphPad Prism 5 (La Jolla, California, Estados Unidos). Los resultados se presentan con media (M)  $\pm$  error estándar (ES) y desviación estándar (DS) o mediana (Md) con sus intervalos intercuartil (IC25 – IC75). Los análisis de datos de dos factores (tratamiento  $\times$  corte, tratamiento  $\times$  día de



evaluación) fueron realizados usando ANOVA de dos vías de medidas repetidas, seguidos de *post hoc* de Bonferroni. Para analizar datos de un solo factor fueron usados ANOVA de una vía seguido de *post hoc* de Tukey o el test de Kruskal-Wallis seguido de un *post hoc* de Dunn, dependiendo de la distribución de datos paramétricos o no paramétricos. La distribución normal de los datos fue evaluada mediante la prueba de Kolmogorov – Smirnov y la verificación de igualdad de varianzas fue realizada con la prueba de Bartlett. El nivel de significancia fue establecido en  $p < 0,05$ .



## Capítulo IV: Resultados

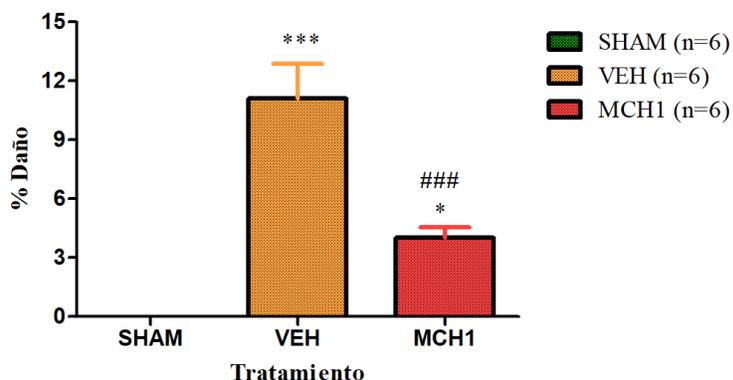
### 4.1 Resultados respecto a los objetivos específicos

#### 4.1.1 Efecto de MCH1 neuroprotector sobre la reducción del área de infarto

La evaluación del efecto neuroprotector de MCH1 sobre la conservación cerebral, fue medida 11 días posteriores a la inducción de la isquemia. Para este fin los cerebros fueron extraídos, seccionados en 7 cortes coronales de 2mm y luego fueron incubados en solución de TTC y PFA. Una comparación por ANOVA de una vía del porcentaje de área de infarto presentado en los tres grupos mostró una diferencia significativa del tratamiento [F (2, 15) = 27,88, p <0,0001]. Un análisis *post hoc* de Tukey arrojó que el grupo vehículo (VEH) presentó un mayor porcentaje de daño ( $11,10 \pm 1,76/\pm 4,32$ ) que el grupo sham (SHAM) ( $0,00 \pm 0,00/\pm 0,00$ ) (p <0,0001), además el grupo tratado con macamida (MCH1) ( $4,01 \pm 0,52/\pm 1,28$ ) (p <0,0001) presentó un porcentaje de daño significativamente mayor que el grupo SHAM (p < 0,05), y a su vez fue significativamente menor que el grupo VEH (p <0,0001) (**Figura 3**).

#### Figura 3

Porcentaje de área de infarto



Nota: Porcentaje de volumen de infarto 11 días posteriores a MCAO. Los datos de la figura muestran los datos de la media ± el error estándar. Significancia estadística cuando p < 0,05 \*diferente de Sham, #diferente de VEH; \* o # p < 0,05; \*\* o ## p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. El número de animales por cada grupo está indicado como n.

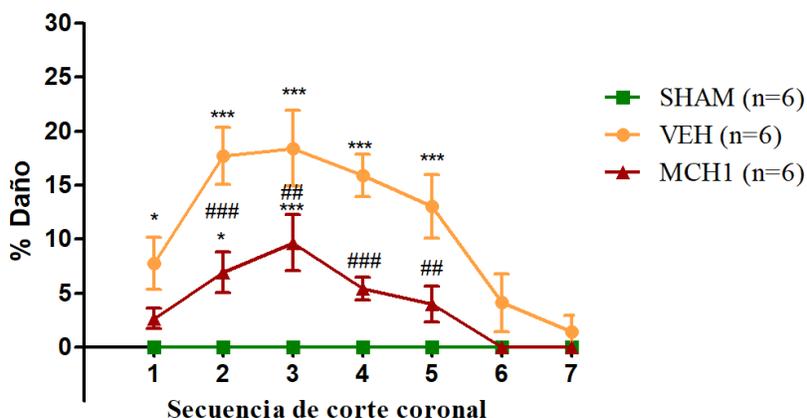


El porcentaje de daño también fue calculado por cada secuencia de corte a partir del volumen total de cada sección, para determinar si el efecto del tratamiento sobre el porcentaje de daño fue dependiente de la secuencia de corte (o área cerebral) fue realizado un análisis de ANOVA de 2 vías de medidas repetidas (tratamiento  $\times$  secuencia de corte). De dicho análisis se encontró interacción significativa entre tratamiento  $\times$  secuencia de corte [ $F(12,90) = 5,75, p < 0,0001$ ], con efecto principal del corte [ $F(6, 90) = 16,92, p < 0,0001$ ] y un efecto principal del tratamiento [ $F(2, 90) = 27,95, p < 0,0001$ ] (**Figura 4**). Un análisis *post hoc* de Bonferroni reveló que el grupo vehículo (VEH) tuvo un mayor porcentaje de daño que el grupo sham (SHAM), en el primer ( $p < 0,05$ ), segundo, tercer, cuarto y quinto corte ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, si bien el grupo MCH1 muestra un mayor porcentaje de daño respecto al SHAM, esta diferencia se restringe al segundo ( $p < 0,05$ ) y el tercer corte ( $p < 0,001$ ), mas no en el primer, cuarto, quinto, sexto o séptimo corte ( $p > 0,05$ ). Además, el porcentaje de daño del grupo MCH1 fue significativamente menor que el grupo VEH en el segundo, cuarto y quinto corte ( $p < 0,01$ ). En los grupos VEH y MCH1, las secciones mayormente afectadas fueron las áreas vinculadas a las funciones sensorio – motoras. Los detalles de la media se encuentran descritos en la **Tabla 5**.

Estos resultados sugieren que la aplicación de MCH1 30 minutos previa a la MCAO y con dosis IP de 3mg/kg durante 10 días de tratamiento, tiene un efecto neuroprotector al reducir el volumen de infarto producido por una isquemia cerebral focal.

**Figura 4**

*Porcentaje de infarto por corte coronal*



Nota: Porcentaje por corte de volumen de infarto 11 días posterior a MCAO. Los datos de la figura muestran los datos de la media  $\pm$  el error estándar. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham, #diferente de vehículo; \* o #  $p < 0,05$ ; \*\* o ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo está indicado como *n*.

**Tabla 5**

*Volumen de infarto por corte cerebral*

CORTE	SHAM	VEH	MCH1
1	0,0 $\pm$ 0,0/ $\pm$ 0,0	7,7 $\pm$ 2,4 / 5,8 *	2,6 $\pm$ 0,9 / 2,2
2	0,0 $\pm$ 0,0/ $\pm$ 0,0	17,8 $\pm$ 2,6 / 6,4 ***	6,9 $\pm$ 1,8 / 4,5 * / ###
3	0,0 $\pm$ 0,0/ $\pm$ 0,0	18,4 $\pm$ 3,4 / 8,5 ***	9,6 $\pm$ 2,5 / 6,3 *** / #
4	0,0 $\pm$ 0,0/ $\pm$ 0,0	15,91 $\pm$ 1,9 / 4,7 ***	5,4 $\pm$ 1,6 / 4,0 ###
5	0,0 $\pm$ 0,0/ $\pm$ 0,0	13,0 $\pm$ 2,9 / 7,1 ***	4,0 $\pm$ 1,6 / 4,0 ##
6	0,0 $\pm$ 0,0/ $\pm$ 0,0	4,1 $\pm$ 2,6 / 6,5	0,0 $\pm$ 0,0/ $\pm$ 0,0
7	0,0 $\pm$ 0,0/ $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 1,5 / 3,5	0,0 $\pm$ 0,0/ $\pm$ 0,0

Nota: resumen de la media del volumen de infarto por corte coronal de 11 días posterior a MCAO de cada grupo. Datos paramétricos representados como:  $M \pm ES / DS$ , donde M=media, ES= error estándar y DS =desviación estándar. Se realizó el análisis de ANOVA de dos vías, seguidos de post hoc de Bonferroni. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$ . \*diferente de Sham, #diferente de vehículo; \* o #  $p < 0,05$ ; \*\* o ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Cada grupo contó con 6 animales para el análisis.

#### 4.1.2 Efecto de MCH1 sobre la respuesta sensorio – motora.

**a. Escala neurológica de García.** Para evaluar el efecto neuroprotector sobre la conservación en la respuesta sensorio – motora, los animales fueron evaluados los días 3 y

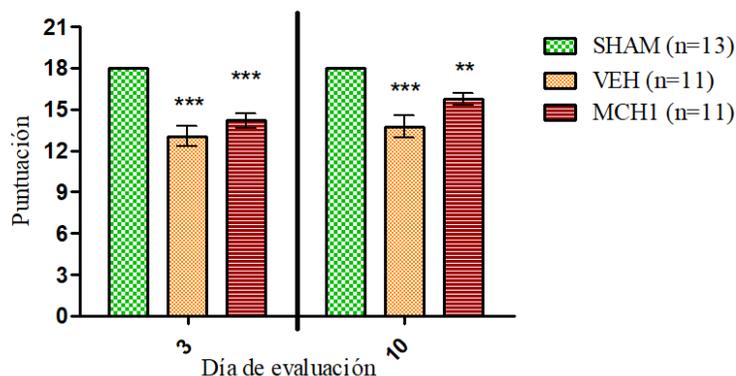


10 posteriores a la isquemia utilizando la escala neurológica de García clásica y modificada. Fueron medidos 7 ítems de actividad espontánea incluyendo simetría de las 4 patas, estiramiento de patas delanteras, escalada y prensión, sensibilidad corpórea, respuesta al toque de bigotes y caminata en círculos. Cada uno de estos ítems fueron calificados con un puntaje de 0 a 3, y la sumatoria (clásica) del puntaje de los 7 ítem fue considerado el puntaje total para cada animal.

Los resultados de la sumatoria clásica y la sumatoria modificada se analizaron por un test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido de un *post hoc* de Dunn. En la evaluación del día 3 post lesión, el análisis de la sumatoria clásica mostró un efecto significativo del tratamiento [ $K = 26,07, p < 0.001$ ]. Un análisis *post hoc* de Dunn reveló que los grupos VEH y MCH1 lograron puntuaciones significativamente menores en la escala neurológica frente a SHAM ( $p < 0.0001$ ), a la vez que las puntuaciones del grupo MCH1 y VEH no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) (**Figura 5**). En la evaluación del día 10 post lesión también se encontró un efecto significativo del tratamiento [ $K = 25,73, p < 0.0001$ ] y un análisis *post hoc* de Dunn reveló que tanto el grupo VEH como MCH1 lograron puntuaciones significativamente menores respecto al SHAM ( $p < 0.0001$  y  $p < 0.05$ ) y el grupo MCH, pese a mostrar una mejor mediana en los puntajes de la escala, no mostró diferencia significativa frente al VEH ( $p > 0.05$ ) (**Figura 5**).

**Figura 5**

*Escala neurológica de García*



Nota: Puntuación de la evaluación neurológica de García a los 3 y 10 días posterior a MCAO. Los datos de la figura muestran los datos de la mediana (IC25-IC75). Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham, \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo está indicado como  $n$ .

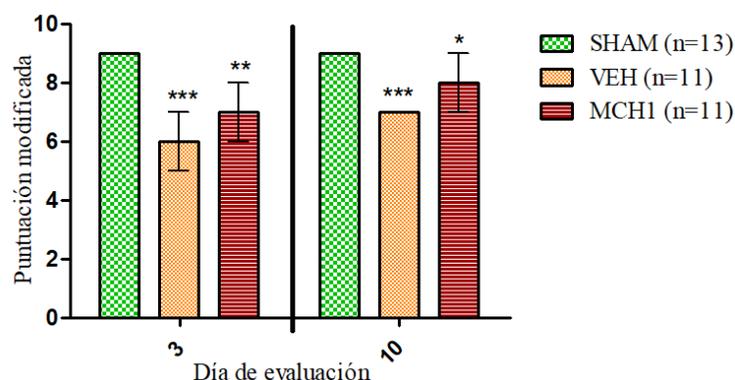
Para efectos de tener una predicción más precisa de la lesión en el córtex motor primario (M1), se obtuvieron puntajes de la escala neurológica de García considerando los ítems de escalada y prensión, respuesta al toque de bigotes y caminata en círculos, como ha sido sugerida en la literatura por Yeh y colaboradores (2018). El análisis estadístico usando el test de Kruskal-Wallis de la puntuación de la evaluación del día 3 post lesión demostró un efecto significativo del tratamiento [ $K = 24,71$ ,  $p < 0.0001$ ]. Un análisis *post hoc* de Dunn encontró que el grupo VEH tuvo un menor desempeño frente a SHAM ( $p < 0,0001$ ). Así mismo el grupo MCH1 presentó puntajes más bajos que SHAM ( $p < 0,01$ ), y aunque presentó una mejor mediana que VEH, esta diferencia no fue significativa ( $p > 0,05$ ) (**Figura 6**).

El análisis del puntaje de evaluación neurológica del día 10 mostró un efecto significativo del tratamiento [ $K = 23,48$ ,  $p < 0.0001$ ]. Un análisis *post hoc* de Dunn reveló que el grupo VEH ( $p < 0,0001$ ) y el grupo MCH1 ( $p < 0,05$ ) mantuvieron puntajes más bajos que el grupo SHAM y los puntajes del grupo MCH1 no fueron significativamente

diferentes al grupo VEH ( $p > 0,05$ ) (**Figura 6**). Los detalles de la mediana de la escala neurológica quedan descritos en la **Tabla 6**.

**Figura 6**

*Escala neurológica de García - puntuación modificada*



Nota: Puntuación modificada de la evaluación neurológica de García a los 3 y 10 días posterior a MCAO. Los datos de la figura muestran los datos de la mediana (IC25-IC75). Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo está indicado como *n*.

**Tabla 6**

*Evaluación neurológica de García modificada*

Día	Puntaje	SHAM	VEH	MCH1	K, p
3	<b>Sumatoria clásica</b>	21,0 (21,0 - 21,0)	15,0 (13,0 - 16,50) ***	17,0 (15,0 - 18,0) ***	K = 26,07, $p < 0.0001$
	<b>Sumatoria modificada</b>	9,0 (9,0 - 9,0)	6,0 (5,0 - 7,0) ***	7,0 (6,0 - 8,0) **	K = 24,71, $p < 0.0001$
10	<b>Sumatoria clásica</b>	21,0 (18,0 - 18,0)	16,0 (16,0 - 17,0) ***	18,0 (17,0 - 20,0) **	K = 25,73, $p < 0.0001$
	<b>Sumatoria modificada</b>	9,0 (9,0 - 9,0)	7,0 (7,0 - 7,0) ***	8,0 (7,0 - 9,0) *	K = 23,48, $p < 0.0001$

Nota: resumen del puntaje clásico y modificado de la evaluación neurológica de García modificada del día 3 y 10 post MCAO, promedio de cada grupo. Datos no paramétricos representados como: Md (IC25 - IC 75), donde Md=mediana, IC= intervalo intercuartil. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunn. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 =11.



**b. Prueba de la retirada de la cinta.** Además de la evaluación neurológica de García, los animales fueron sometidos a dos evaluaciones adicionales, la de la prueba de retirada de cinta para verificar el grado de compromiso de la sensación táctil y respuesta motora simétrica de las extremidades derecha e izquierda en animales MCAO. Dicha prueba consistió en colocar cintas adhesivas en las patas delanteras de las ratas y evaluar el tiempo de sensibilidad para detectar la cinta y el tiempo para retirarla.

El análisis de la latencia para la retirada de la cinta fue mediante un análisis de ANOVA de 2 vías de medidas repetidas (tratamiento  $\times$  lateralidad), mostró una interacción significativa en el día 3 post lesión [ $F(2,32) = 8,11, p=0,0014$ ], con efecto principal del tratamiento [ $F(2,32) = 8,19, p=0,0013$ ] y un efecto principal de lateralidad [ $F(1,32) = 27,57, p<0,0001$ ]. Un análisis *post hoc* de Bonferroni reveló que los animales del grupo SHAM demoraron un tiempo no mayor a 5 segundos en sentir la cinta en la pata contralateral (media del grupo sham ( $M_{SHAM}$ ) = 2,0 s) o ipsilateral ( $M_{SHAM}$  = 3,4 s) a la lesión ( $p>0,05$ ), mientras que los animales de los grupos VEH y MCH1 demoraron un tiempo significativamente mayor para sentir la cinta en la pata contralateral (media del grupo vehículo ( $M_{VEH}$ ) = 87,0 s y media del grupo MCH1 ( $M_{MCH1}$ ) = 41,4 s) a la lesión respecto a la pata del lado ipsilateral ( $M_{VEH}$  = 48,1 s,  $M_{MCH1}$  = 3,3 s) ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 7A**). Además, la comparación *post hoc* también reveló que la latencia para sentir la cinta en la pata contralateral fue significativamente mayor en el grupo VEH respecto al SHAM ( $p<0,0001$ ) y MCH1 ( $p<0,05$ ), además MCH1 no fue significativamente diferente del grupo SHAM ( $p>0,05$ ).

Asimismo, el análisis de la latencia de retirada de la cinta, medición del aspecto motor, reveló una interacción significativa entre tratamiento  $\times$  lateralidad [ $F(2,32) = 11,59, p = 0,0002$ ] con efecto principal del tratamiento [ $F(2,32) = 37,45, p<0,0001$ ] y un efecto



principal de lateralidad [ $F(1,32) = 40,78, p < 0,0001$ ]. Un análisis *post hoc* de Bonferroni reveló que los animales del grupo SHAM demoraron tiempo no mayor a 15 segundos para retirar la cinta de las patas contra e ipsilateral ( $M_{SHAM} = 11,4, M_{SHAM} = 13,5$  s, respectivamente) ( $p > 0,05$ ), mientras que los animales de los grupos VEH y MCH1 demoraron un tiempo significativamente mayor para retirar la cinta de la pata contralateral ( $M_{VEH} = 171,9$  s,  $M_{MCH1} = 157,0$  s) la lesión respecto a la pata del lado ipsilateral ( $M_{VEH} = 85,4$  s,  $M_{MCH1} = 68,8$  s) ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 7B**). Además, la comparación *post hoc* también reveló que las latencias para retirar la cinta en la pata contralateral fueron significativamente mayores en los grupos VEH y MCH1 respecto al SHAM ( $p < 0,0001$ ) y no se encontró diferencias significativas entre los grupos VEH y MCH1 ( $p > 0,05$ ). Estos resultados indican que al día 3 post lesión los animales expuesto a MCAO exhiben una pérdida sensorial y motora en el lado contralateral a la lesión y que el tratamiento con MCH1 parece aliviar el déficit sensorial mas no el motor.

Al día 10 post lesión, los animales fueron evaluados nuevamente en la prueba de retirada de la cinta. El análisis de ANOVA de 2 vías de medidas repetidas mostró una interacción positiva entre los factores tratamiento x lateralidad [ $F(2,32) = 4,21, p = 0,0238$ ] con efecto principal del tratamiento [ $F(2,32) = 4,21, p = 0,0377$ ] y un efecto principal de lateralidad [ $F(1,32) = 8,977, p = 0,0013$ ]. Un análisis *post hoc* de Bonferroni, reveló que los animales del grupo SHAM tardan menos de 5 segundos para sentir la cinta de las patas contra e ipsilateral ( $M_{SHAM} = 1,9, M_{SHAM} = 2,5$  s, respectivamente) ( $p > 0,05$ ), mientras que los animales del grupo VEH tardan un tiempo significativamente mayor para sentir la cinta en la pata contralateral ( $M_{VEH} = 44,3$  s) a la lesión respecto a la ipsilateral ( $M_{VEH} = 22,3$  s) ( $p < 0,01$ ) y si bien MCH1 también presenta diferencia al sentir la cinta en la pata contra ( $M_{MCH1} = 15,8$  s) e ipsilateral ( $M_{MCH1} = 2,28$  s), esta no fue significativa ( $p > 0,05$ ) (**Figura**



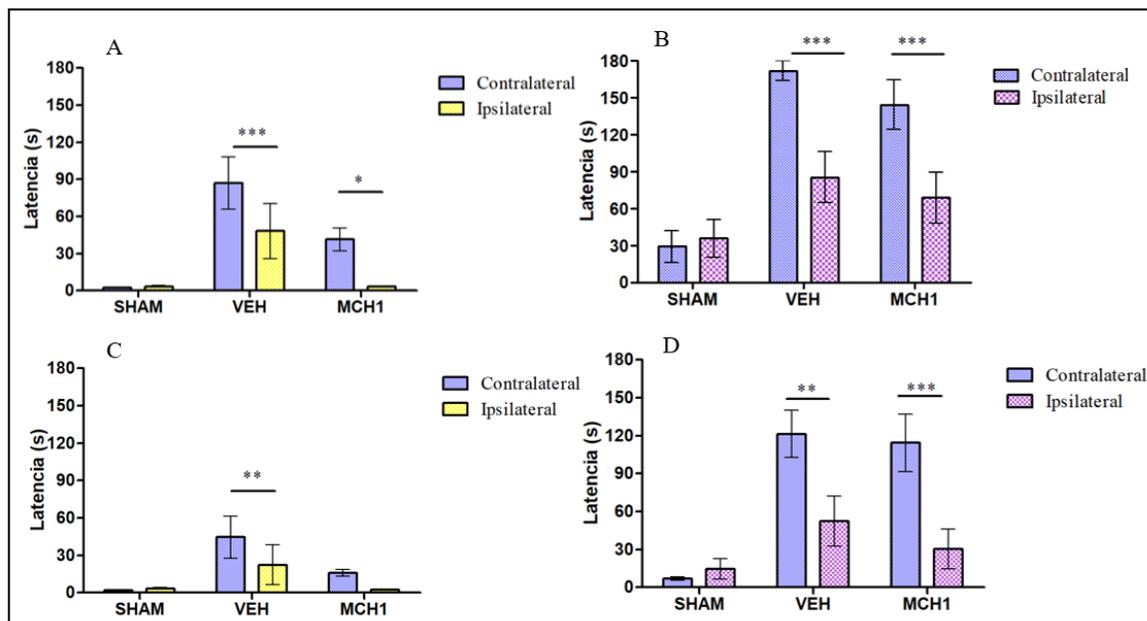
7C). Asimismo, el análisis *post hoc* reveló que el grupo VEH demoró un tiempo significativamente mayor para sentir la cinta en la pata contralateral que el grupo SHAM ( $p < 0.01$ ) y la latencia del grupo MCH1 no fue diferente del grupo VEH, ni tampoco del SHAM ( $p > 0.05$ ).

El análisis de retirada de cinta en el día 10 post lesión mostró una interacción significativa entre tratamiento x lateralidad [ $F(2,32) = 7,08, p = 0,0028$ ] con efecto principal del tratamiento [ $F(2,32) = 13,18, p < 0,0001$ ] y un efecto principal de lateralidad [ $F(1,32) = 26,00, p < 0,0001$ ]. Un análisis *post hoc* de Bonferroni reveló que los animales del grupo SHAM tardan un tiempo menor a 10 segundos para retirar la cinta de la pata ipsilateral o contralateral a la lesión patas ( $M_{SHAM \text{ ipsilateral}} = 5,7 \text{ s}$ ,  $M_{SHAM \text{ contralateral}} = 5,8 \text{ s}$ , respectivamente) ( $p > 0.05$ ); mientras que los del grupo VEH ( $p < 0.001$ ) y MCH1 ( $p < 0.0001$ ) tardan un tiempo significativamente mayor en retirar la cinta de la pata contralateral ( $M_{VEH} = 121,2 \text{ s}$ ,  $M_{MCH1} = 129,5 \text{ s}$ ) respecto a la ipsilateral ( $M_{VEH} = 52,3 \text{ s}$ ,  $M_{MCH1} = 30,2 \text{ s}$ ) a la lesión (**Figura 7D**). Asimismo, el análisis *post hoc* reveló que el grupo VEH y MCH1 demoran un tiempo significativamente mayor para retirar la cinta en la pata contralateral que el grupo SHAM ( $p < 0.0001$ ) y la latencia del grupo MCH1 no fue diferente del grupo VEH ( $p > 0.05$ ).

Estos resultados indican que al día 10 post lesión los animales expuesto a MCAO aún mantienen una pérdida sensorial y motora en el lado contralateral a la lesión y que el tratamiento con MCH1 parece aliviar el déficit sensorial mas no el motor.

**Figura 7**

*Simetría del lado contralateral vs ipsilateral*



Nota: Los gráficos A y C muestran las diferencias sensitivas del lado contralateral vs el lado ipsilateral a la lesión en los días 3 y 10, respectivamente. Los gráficos B y D, muestran las diferencias motoras del lado contralateral vs el lado ipsilateral a la lesión en los días 3 y 10, respectivamente. Datos representados en la media y desviación estándar, significancia estadística cuando  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 = 11.

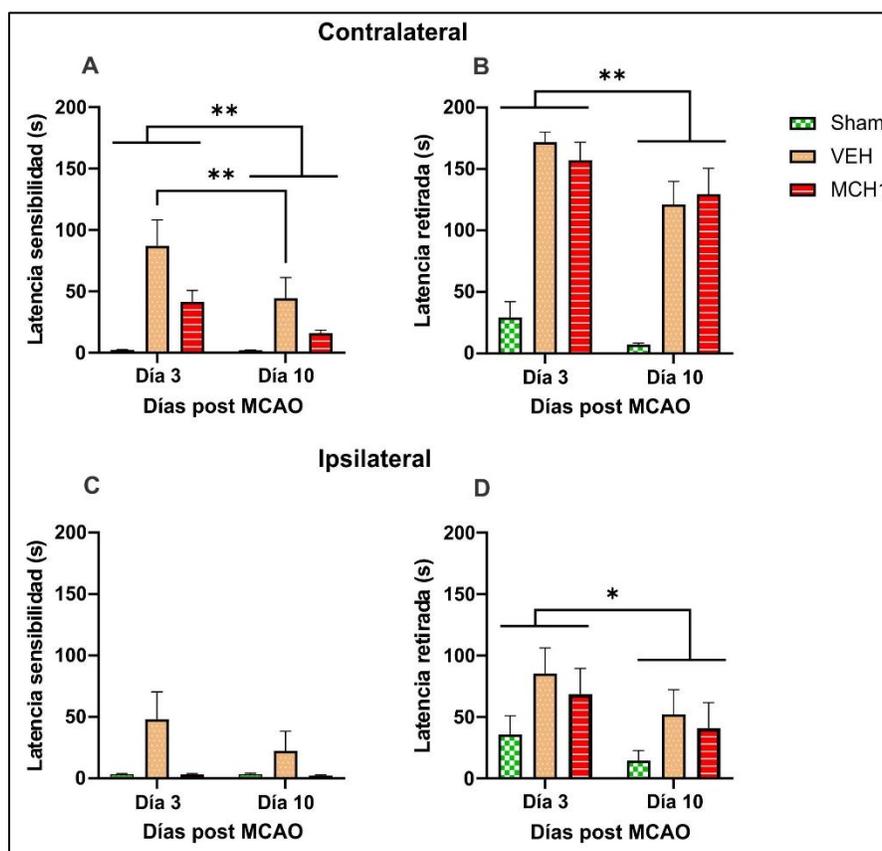
En la prueba de retirada de cintas se observó una recuperación de sensibilidad en la pata contralateral, entre la evaluación del día 3 al día 10, independientemente del tratamiento aplicado, mostró una mejora natural con el paso del tiempo [ $F(1,34) = 11,92, p = 0,0015$ ], al realizar un post hoc para conocer si hay diferencia entre los tratamientos, solo el grupo VEH mostró una recuperación significativa del día 3 al día 10 ( $p = 0,0033$ ). Estos resultados sugieren que la lesión induce un deterioro sensorio – motor agudo en el día 3, daño evidenciado en el grupo VEH, mas no por el grupo MCH1, por lo que la recuperación hacia el día 10 fue significativa en el grupo VEH y no en MCH1 ( $p = 0,1218$ ), sugiriendo que la aplicación de MCH1 podría haber mostrado un efecto protector agudo (**Figura 8A**). La pata ipsilateral no presentó gran afectación en la sensibilidad en los grupos SHAM y



MCH1, y tampoco se observó una recuperación independiente al tratamiento entre el día 3 y 10 (**Figura 8C**). La función motora mostró ser la más afectada, aunque presentó una recuperación independiente al tratamiento aplicado entre el día 3 al 10, indicando una remisión natural de los síntomas en el tiempo, tanto en la pata contralateral [ $F(1,34) = 14,28, p = 0,0006$ ] (**Figura 8B**), como ipsilateral [ $F(1,34) = 5,608, p = 0,0237$ ] (**Figura 8D**).

### Figura 8

*Recuperación independiente al tratamiento.*



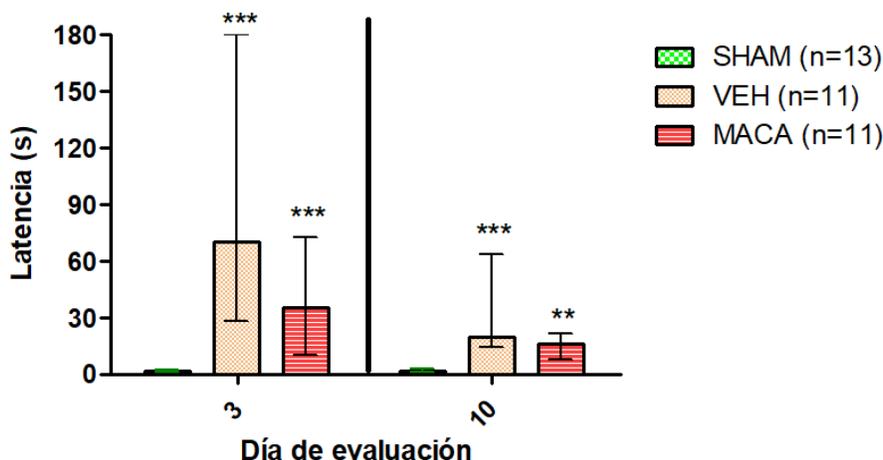
Nota: Los gráficos muestran la recuperación del día 3 al día 10 del lado contralateral (gráficos A y C) y del lado ipsilateral (B y D), también muestran si hubo diferencias específicas a un grupo de tratamiento. Datos representados en la media y desviación estándar, significancia estadística cuando  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 = 11.



Para determinar el efecto del tratamiento en la prueba de retirada de cinta de manera independiente del día de la evaluación, la respuesta sensitiva del lado contralateral fue analizada en los días 3 y 10 a partir del test no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de un post hoc de Dunn. De este análisis se encontró que en el día 3, el grupo VEH (Md: 70,0 s (28,0 – 180,0)) tuvo una latencia significativamente mayor para detectar la cinta adhesiva que el grupo SHAM (Md: 1,6 s (1,3 – 2,6) ( $p < 0,001$ )). Así también, el grupo MCH1 (Md: 35,6 s (10,3 – 72,3) tuvo una mayor latencia para detectar la cinta que SHAM ( $p < 0,001$ ), y la latencia de MCH1 no fue significativamente diferente del grupo VEH ( $p > 0,05$ ). En la evaluación del día 10, el grupo VEH (Md: 20,0 s (14,6 – 63,6)) tuvo una latencia significativamente mayor que SHAM (Md: 1,6 s (1,0 – 2,8)) ( $p < 0,001$ ). Mientras que la latencia de MCH1 no fue significativamente diferente del grupo VEH (Md: 16,0 s (7,6 – 21,6)) ( $p > 0,05$ ), MCH1 mostró una reducción en la latencia de respuesta frente a SHAM ( $p < 0,01$ ) (Figura 9).

**Figura 9**

*Prueba de retirada de cinta adhesiva del lado contralateral – sensibilidad*



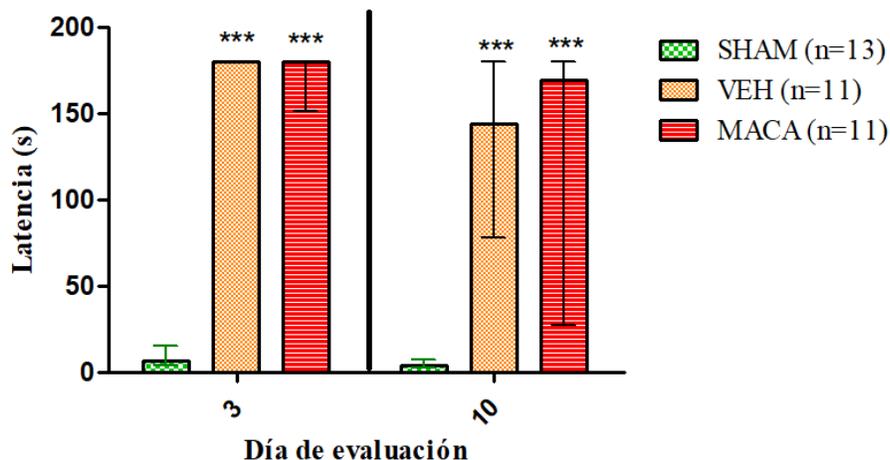
Nota: Latencias obtenidas de la sensibilidad a la cinta de la pata contralateral (izquierda), 3 y 10 días posteriores a MCAO. Los datos de la figura muestran los datos de la mediana (IC25-IC75). Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo está indicado como *n*.



En el análisis de la respuesta motora del mismo test en el lado contralateral en el día 3 (**Figura 9**), se encontró latencias de respuesta de retirada de cinta significativamente mayores en los grupos VEH (Md: 180,0 s (180,0-180,0)) y MCH1 (Md:180,0 s (151,0-180,0)) frente a SHAM (Md: 6,6 s (4,1-15,1)) (p < 0,00, para ambas comparaciones). Las latencias de respuesta de los grupos VEH y MCH1 no fueron significativamente diferentes (p > 0,05). En el día 10, las latencias de retirada en los grupos VEH y MCH1 continuaron significativamente mayores que el grupo SHAM (p < 0,001); mientras que, las latencias de los grupos VEH y MCH1 no mostraron diferencias significativas (p>0,05).

**Figura 10**

*Prueba de retirada de cinta adhesiva del lado contralateral – motricidad*



Nota: Latencias obtenidas del tiempo de retirada de cinta de la pata contralateral (izquierda), 3 y 10 días posterior a MCAO. Los datos de la figura muestran los datos de la mediana (IC25-IC75). Significancia estadística cuando p < 0,05 \*diferente de Sham; \*p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. El número de animales por cada grupo está indicado como n.

Aunque los efectos a nivel de la función sensorio-motora son más significativos en la extremidad contralateral a la lesión, se hizo un análisis respecto al lado ipsilateral a la lesión (lado derecho), mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. En el día 3, el análisis mostró diferencia significativa en la respuesta motora entre los grupos, mas no en



la sensitiva (**Tabla 7**). El análisis post hoc de Dunn de la respuesta motora reveló que el grupo VEH (Md: 48,0 s) presentó un tiempo de retirada significativamente mayor que SHAM (Md: 12,0 s) ( $p < 0,001$ ). Por otro lado, el grupo MCH1 (Md: 31,0 s) presentó una latencia significativamente mayor a SHAM ( $p < 0,05$ ) y no mostró diferencia significativa frente a VEH ( $p > 0,05$ ).

**Tabla 7**

*Evaluación sensorio-motora de prueba de retirada de cintas*

Día	Lado de la lesión Latencia (s)	Contralateral (izquierda)				Ipsilateral (derecha)			
		SHAM	VEH	MCH1	K, p	SHAM	VEH	MCH1	K, p
3	<b>Sensibilidad</b>	1,6 (1,3 -2,6)	70,0 (28,0-180,0) ***	35,6 (10,3-72,3) ***	K=23,96, p<0.0001	2,3(1,8-5,1)	4,3 (3,3-121,3)	4,0 (1,3-5,0)	K=5,109, p=0,0777
	<b>Retirada</b>	6,6 (4,1-15,1)	180,0 (180,0-180,0) ***	180,0 (151,0-180,0) ***	K=26,36, p<0.0001	12,0(5,5-14,3)	48,0 (27,6-180) ***	31,0 (15,3-132,0) *	K=15,32, p=0,0005
10	<b>Sensibilidad</b>	1,6 (1,0 - 2,8)	20,0 (14,6-63,6) ***	16,0 (7,6 - 21,6) **	K=20,87, p<0.0001	2,6 (1,6-3,5)	2,6(1,6 - 12,67)	1,6 (1,0 - 3,0)	K=18,52, p=0,1243
	<b>Retirada</b>	4,3 (2,8 -7,3)	143,7 (77,6 - 180) ***	180,0 (46,6-180,0) ***	K=24,18, p<0.0001	5,3(3,4-7,5)	17,3(15,0 -76,6) ***	12,3(6,0-14,6)	K=15,32, p<0,0001

Nota: resumen de la evaluación sensorio-motora de prueba de retirada de cintas del día 3 y 10 post MCAO, promedio de cada grupo. Datos no paramétricos representados como: Md (IC25 - IC 75), donde Md=mediana, IC= intervalo intercuartil. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunn. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 =11.

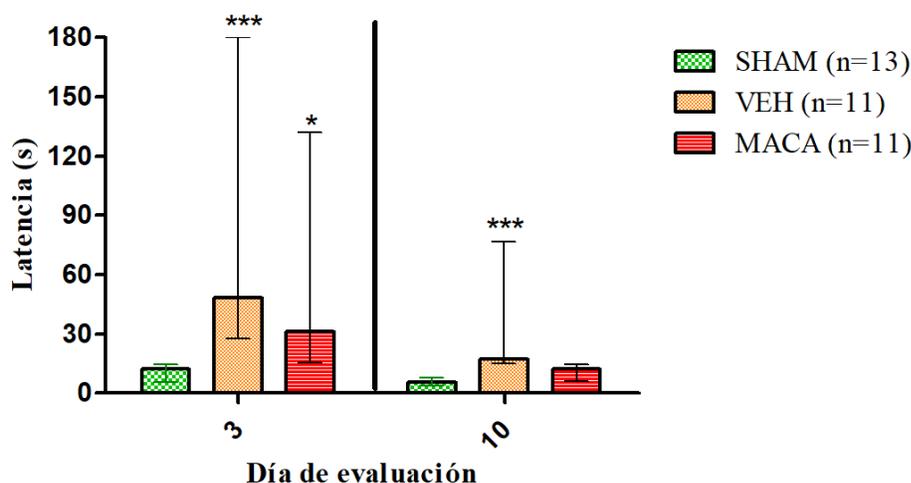
En la evaluación del día 10, el análisis mostró diferencia significativa en la respuesta motora entre los grupos, mas no en la sensitiva (**Tabla 7**). El análisis post hoc de Dunn de la respuesta motora reveló que el grupo VEH (Md: 17,3 s) presentó un tiempo de latencia significativamente mayor que SHAM (Md: 5,3 s) ( $p < 0,001$ ) y la latencia de respuesta de MCH1 (Md: 12,3 s) no fue significativamente diferente de VEH o SHAM ( $p > 0,05$ ) (**Figura 11**).



Los resultados muestran que el tratamiento de 10 días con MCH1 parece tener un efecto sobre el déficit sensorial del lado contralateral y motor del lado ipsilateral, al encontrar el grupo MCH1 disminuye o deja de presentar diferencia con el grupo SHAM en estas áreas.

**Figura 11**

*Prueba de retirada de cinta adhesiva del lado ipsilateral – motricidad*



Nota: Latencias obtenidas del tiempo de retirada de cinta de la pata ipsilateral (derecha), 3 y 10 días posterior a MCAO. Los datos de la figura muestran los datos de la mediana (IC25-IC75). Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham; \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo está indicado como  $n$ .

### **c. Prueba de la caminata en malla.** Realizada para evaluar las deficiencias

motoras de extremidades anteriores y posteriores en los animales MCAO. El grado de deficiencia motora de cada extremidad fue medido mediante la cuantificación del número de errores que cometían los animales al deslizar la pata a través de los agujeros de la malla. El mayor número de errores que se registraron en los animales con MCAO (VEH y MCH1) fue en la pata delantera del lado contralateral a la lesión, tanto el día 3 como el día 10 post lesión. Los resultados de la prueba de la caminata en malla de los días 3 y 10, fueron sometidos a un test de Kruskal-Wallis, los datos de la mediana y la diferencia entre grupos



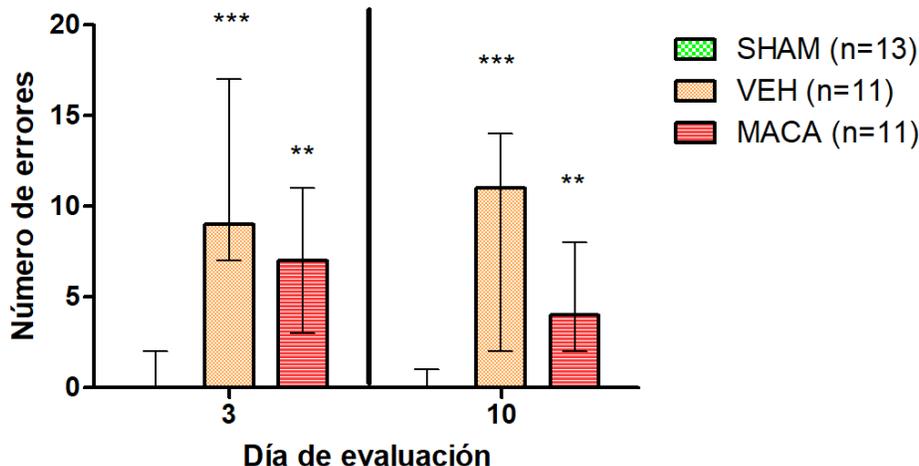
se encuentran detallados en la **Tabla 8**. Un *post hoc* de Dunn reveló que en el día 3, el número de errores de la pata delantera contralateral a la lesión (lado izquierdo) del grupo VEH fue significativamente mayor que el grupo SHAM ( $p < 0,001$ ). Así mismo, el grupo MCH1 también tuvo un número significativamente mayor de errores que el grupo SHAM ( $p < 0,01$ ). No se encontró diferencias significativas entre el grupo MCH1 y VEH ( $p > 0,05$ ) (**Figura 12**).

En las evaluaciones del día 10 post lesión, estas diferencias entre los grupos se mantienen con el mismo nivel de significancia, aunque con una variación en las medianas en relación al día 3 post-lesión, SHAM (Md día 3 vs Día 10: 1, 0 s vs a 0,0 s), VEH (Md día 3 vs Día 10: 9, 0 s vs 11, 0 s) y MCH1 (Md día 3 vs Día 10: 7, 0 s a 4, 0 s) (**Figura 12**).

Estos resultados indican que la isquemia inducida por MCAO lleva a una deficiencia motora importante restringida al miembro superior contralateral a la lesión, la cual se mantiene sin mejora del día 3 al 10 post lesión, sobre el cual no se observa efecto del tratamiento con MCH1. Al día 3 post lesión, los animales MCAO también presentan déficit motor en la pata delantera ipsilateral a la lesión, el cual parece haber sido ligeramente aliviada por el tratamiento con MCH1. Sin embargo, la lesión en la pata ipsilateral lateral a la lesión parece ser un efecto agudo de MCAO, pues el déficit motor observado el día 3 no fue más observado el día 10, donde la función motora de la pata ipsilateral de los tres grupos fue semejante.

**Figura 12**

*Prueba de caminata en malla pata delantera contralateral*



Nota: Número de errores de la pata delantera contralateral (izquierda), 3 y 10 días posterior a MCAO. Los datos de la figura muestran la media  $\pm$  el error estándar. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo está indicado como n.

**Tabla 8**

*Prueba de caminata en malla día 3 y 10*

Día	Lado de la lesión	Contralateral (izquierda)				Ipsilateral (derecha)			
		Número de errores	SHAM	VEH	MCH1	K, p	SHAM	VEH	MCH1
3	Patas delanteras	1,0 (0,0-2,0)	9,0 (7,0-11,0) ***	7,0 (3,0-10,0) **	K=18,39, p<0.0001	0,0 (0,0-0,0)	1,0 (0,0-2,0) *	0,0 (0,0-1,0)	K=6,455, p=0,0397
	Patas traseras	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-2,0)	0,0 (0,0-1,0)	K=3,16, p=0.2052	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	K=2,30, p=0,3156
10	Patas delanteras	0,0 (0,0-1,0)	11,0 (2,0-14,0) ***	4,0 (2,0-8,0) **	K=20,31, p<0.0001	0,0 (0,0-0,5)	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-1,0)	K=0,5, p=0,7735
	Patas traseras	0,0 (0,0-0,0)	2,0 (0,0-3,0)	0,0 (0,0-1,0)	K=4,18, p=0.1232	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)	K=0,07, p=0.9622

Nota: resumen de la evaluación sensorio-motora con la prueba de caminata en malla del día 3 y 10 post MCAO, promedio de cada grupo. Datos no paramétricos representados como: Md (IC25 - IC 75), donde Md=mediana, IC= intervalo intercuartil. Se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunn. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham, #diferente de vehículo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 =11.



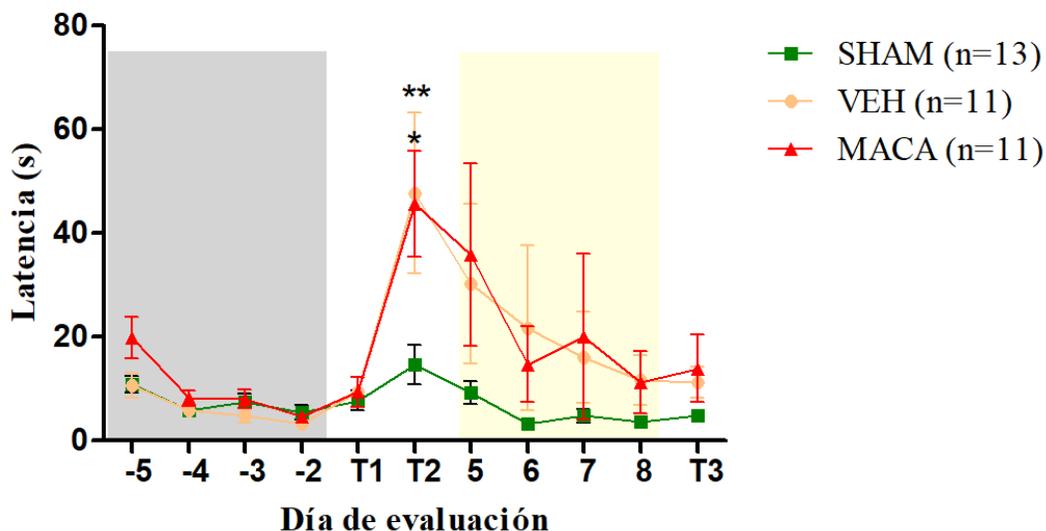
#### *4.1.3 Efecto de MCH1 sobre el aprendizaje espacial.*

El efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en el alivio de deterioro de aprendizaje fue evaluado por medio del test de Barnes, usando los parámetros de latencia primaria y errores primarios de los 4 días de entrenamiento de adquisición realizado un día después del día de habituación al sistema y los 4 días de adquisición reversa aplicados al día siguiente del segundo test de adquisición. Se pueden analizar a partir de los resultados de la latencia primaria de los días de adquisición del test de Barnes. Estas latencias primarias que se obtuvieron en el test de adquisición fueron indicadores de aprendizaje y los resultados son graficados en la **Figura 13**. Un análisis de ANOVA de dos vías de medidas repetidas (tratamiento  $\times$  día de adquisición), señaló que no existía interacción significativa entre tratamiento  $\times$  día de adquisición [ $F(20, 320) = 1,291, p = 0,1820$ ], habiendo un efecto principal del día de evaluación [ $F(10, 320) = 7,522, p < 0,0001$ ], mas no del tratamiento [ $F(2, 320) = 2,123, p = 0,1362$ ]. Un análisis de Bonferroni arrojó que el día del segundo test de adquisición existe diferencia significativa entre los grupos VEH y SHAM ( $p < 0,01$ ) y entre el grupo MCH1 y SHAM ( $p < 0,05$ ). Los detalles de la media quedan descritos en la **Tabla 12**.

Otro parámetro para medir el aprendizaje espacial fue el número de errores cometido por el animal antes de encontrar la caja de escape en el test de Barnes. Un análisis de ANOVA de dos vías de medidas repetidas (tratamiento  $\times$  día de evaluación), señaló que no existía interacción significativa entre tratamiento  $\times$  día de evaluación [ $F(20, 320) = 0,860, p = 0,6382$ ], siendo el efecto principal del día de evaluación [ $F(10, 320) = 4,121, p < 0,0001$ ] y el tratamiento [ $F(2, 320) = 0,7389, p = 0,4856$ ] (**Figura 14**). Los detalles de la media quedan descritos en la **Tabla 13**.

**Figura 13**

*Test de Barnes - latencia primaria*

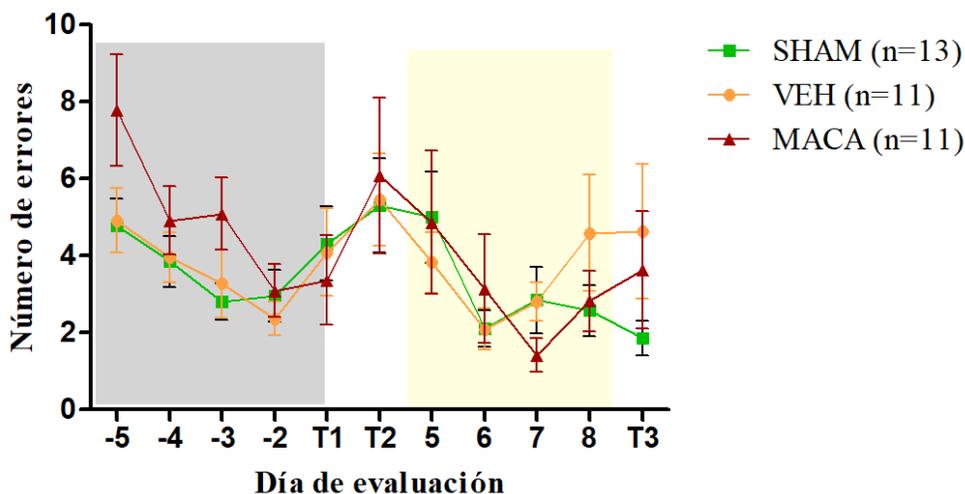


Nota: Latencia en segundos para llegar a la zona correcta. Los datos de la figura muestran los datos de la media  $\pm$  el error estándar. Se realizó el análisis de ANOVA de dos vías, seguidos de *post hoc* de Bonferroni. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo está indicado como n.

Estos resultados sugieren que la aplicación de MCH1 30 minutos previos a la MCAO y con tratamiento de dosis IP de 3mg/kg cada 24 horas durante 10 días, no indujo ningún cambio sobre el aprendizaje espacial, dado que según los datos obtenidos el aprendizaje espacial se mantuvo conservado en todos los grupos, sugiriendo que la inducción de isquemia cerebral focal no llegó a dañar zonas que involucren el aprendizaje espacial, al menos medida con la prueba de Barnes, o que esta función no se vio afectada para la temporalidad en que se evaluó.

**Figura 14**

*Test de Barnes - errores primarios*



Nota: Número de errores antes del primer contacto a la caja de escape. Los datos de la figura muestran los datos de la media  $\pm$  el error estándar. Se realizó el análisis de ANOVA de dos vías, seguidos de post hoc de Bonferroni. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$  \*diferente de Sham, #diferente de vehículo; \* o #  $p < 0,05$ ; \*\* o ##  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo está indicado como n.

**Tabla 9**

*Test de Barnes - Entrenamiento de adquisición*

Entrenamiento		SHAM	VEH	MCH1
Adquisición	Día 1	10,8 ( $\pm 1,6/ \pm 5,9$ )	10,8 ( $\pm 2,3 / 7,9$ )	19,7 ( $\pm 4,0/ \pm 13,2$ )
	Día 2	5,8 ( $\pm 0,9/ \pm 3,5$ )	5,9 ( $\pm 1,1/ \pm 3,8$ )	8,1 ( $\pm 1,4/ \pm 4,9$ )
	Día 3	7,4 ( $\pm 1,4/ \pm 5,3$ )	4,7 ( $\pm 1,2/ \pm 4,3$ )	8,0 ( $\pm 1,8/ \pm 6,0$ )
	Día 4	7,7 ( $\pm 1,9 / \pm 6,8$ )	3,1 ( $\pm 0,4 / \pm 1,4$ )	4,6 ( $\pm 1,1/ \pm 3,7$ )
Adquisición reversa	Día 1	9,2 ( $\pm 2,2/ \pm 8,0$ )	30,2 ( $\pm 15,4 / \pm 51,1$ )	35,9 ( $\pm 17,5/ \pm 58,3$ )
	Día 2	3,3 ( $\pm 0,6/ \pm 2,2$ )	21,7 ( $\pm 15,8/ \pm 29,1$ )	14,7 ( $\pm 7,3/ \pm 24,4$ )
	Día 3	4,7 ( $\pm 1,2/ \pm 4,3$ )	15,9 ( $\pm 8,7/ \pm 29,1$ )	19,9 ( $\pm 16,0/ \pm 53,1$ )
	Día 4	3,5 ( $\pm 0,7/ \pm 2,7$ )	11,5 ( $\pm 4,7/ 15,8$ )	11,2 ( $\pm 5,9 / \pm 19,7$ )

Nota: resumen de la media de latencias de cada grupo de los días de adquisición (pre – MCAO) y de adquisición reversa (post – MCAO). Datos paramétricos representados como:  $M \pm ES / DS$ , donde M=media, ES= error estándar y DS =desviación estándar. Se realizó el análisis de ANOVA de una vía, significancia estadística cuando  $p < 0,05$ . El número de animales por cada grupo fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 =11.



**Tabla 10**

*Test de Barnes - Errores primarios*

Días de evaluación	Grupos de tratamiento		
	SHAM	VEH	MCH1
<b>Entrenamiento de adquisición día 1</b>	4,7 ( $\pm 0,7 / \pm 2,5$ )	4,9 ( $\pm 0,8 / \pm 2,7$ )	7,7 ( $\pm 1,4 / \pm 4,8$ )
<b>Entrenamiento de adquisición día 2</b>	3,8 ( $\pm 0,6 / \pm 2,3$ )	3,9 ( $\pm 0,6 / \pm 2,1$ )	4,9 ( $\pm 0,8 / \pm 2,9$ )
<b>Entrenamiento de adquisición día 3</b>	2,8 ( $\pm 0,4 / \pm 1,7$ )	3,2 ( $\pm 0,8 / \pm 2,9$ )	5,0 ( $\pm 0,9 / \pm 3,0$ )
<b>Entrenamiento de adquisición día 4</b>	2,9 ( $\pm 0,6 / \pm 2,4$ )	2,3 ( $\pm 0,4 / \pm 1,4$ )	3,0 ( $\pm 0,6 / \pm 2,2$ )
<b>Test de adquisición día 1</b>	4,3 ( $\pm 0,9 / \pm 3,4$ )	4,0 ( $\pm 1,1 / \pm 3,7$ )	3,3 ( $\pm 1,1 / \pm 3,8$ )
<b>Test de adquisición día 2</b>	5,3 ( $\pm 1,2 / \pm 4,3$ )	5,4 ( $\pm 1,1 / \pm 3,9$ )	6,0 ( $\pm 2,0 / \pm 6,7$ )
<b>Entrenamiento reverso día 1</b>	5,0 ( $\pm 1,1 / \pm 4,2$ )	3,8 ( $\pm 0,7 / \pm 2,6$ )	4,8 ( $\pm 1,8 / \pm 6,1$ )
<b>Entrenamiento reverso día 2</b>	2,1 ( $\pm 0,4 / \pm 1,7$ )	2,0 ( $\pm 0,5 / \pm 1,7$ )	3,1 ( $\pm 1,4 / \pm 4,6$ )
<b>Entrenamiento reverso día 3</b>	2,8 ( $\pm 0,8 / \pm 3,1$ )	2,8 ( $\pm 0,4 / \pm 1,6$ )	1,4 ( $\pm 0,4 / \pm 1,4$ )
<b>Entrenamiento reverso día 4</b>	2,5 ( $\pm 0,6 / \pm 2,3$ )	4,5 ( $\pm 1,5 / \pm 4,9$ )	2,8 ( $\pm 0,7 / \pm 2,6$ )
<b>Test de adquisición reversa</b>	1,8 ( $\pm 0,4 / \pm 1,6$ )	4,6 ( $\pm 1,7 / \pm 5,8$ )	3,6 ( $\pm 1,5 / \pm 5,0$ )

Nota: resumen de la media de errores primarios por cada grupo de los días de adquisición y test (pre – MCAO), segundo test de adquisición, entrenamiento de adquisición reversa y test de adquisición reversa (post – MCAO). Datos paramétricos representados como:  $M \pm ES / DS$ , donde M=media, ES= error estándar y DS =desviación estándar. Se realizó el análisis de ANOVA de dos vías, significancia estadística cuando  $p < 0,05$ . El número de animales por cada grupo fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 =11.

#### **4.1.4 Efecto de MCH1 sobre la memoria espacial.**

Para evaluar el efecto neuroprotector de MCH1 sobre la memoria espacial se utilizó el Test de Barnes. El protocolo de entrenamiento dio inicio a los 8 días previos a la MCAO, con 2 días de habituación a la sala de evaluación, 1 día de entrenamiento al sistema, 4 días de entrenamiento de adquisición con tres intentos al día y pasadas 24 horas del último entrenamiento se llevó a cabo el test de adquisición (T1). Pasados 4 días de la inducción de la isquemia, se llevó a cabo el mismo test para evaluar memoria espacial (T2). Al quinto día

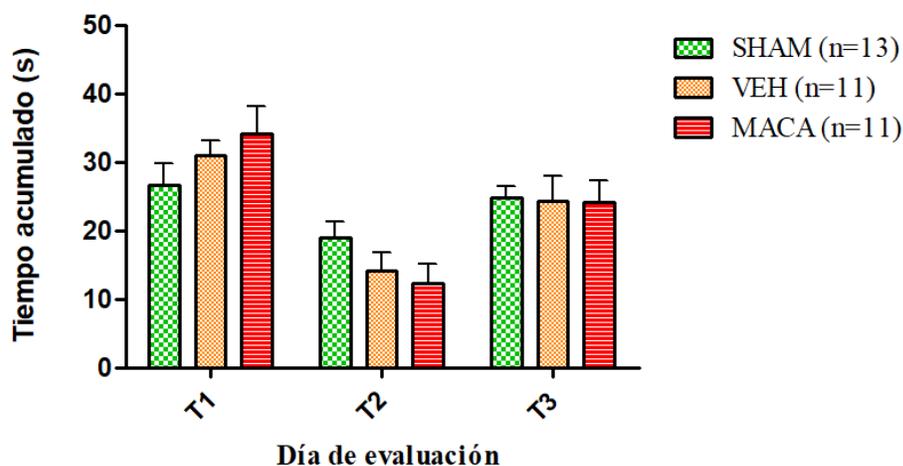


se prosiguió con el entrenamiento de aprendizaje reverso, donde se entrenó-al animal para encontrar una nueva ubicación de la caja de escape. Este entrenamiento se realizó en 4 días, con 3 ensayos diarios. Después de 24 horas del último entrenamiento, se realizó el test de adquisición reversa (T3). Para la evaluación de la memoria espacial se consideraron como indicadores la latencia (segundos) para entrar a la caja de escape y el tiempo acumulado de exploración en la zona correcta (agujero de caja de escape y los adyacentes) en los días del test de adquisición.

El análisis del tiempo acumulado del test de adquisición y de test reverso pasaron por un análisis de ANOVA de 2 vías de medidas repetidas (tratamiento  $\times$  día de evaluación) y mostró efecto principal de los días de evaluación [ $F(2,64) = 20,40, p < 0,0001$ ], sin efecto principal del tratamiento [ $F(2,64) = 0,02, p > 0,05$ ] o interacción significativa entre tratamiento  $\times$  día de evaluación [ $F(4,64) = 1,54, p > 0,05$ ] (**Figura 15**).

**Figura 15**

*Tiempo acumulado en Test de Barnes*



Nota: Tiempo acumulado en zona correcta, comparación por grupo de tratamiento en los test de adquisición (T1 y T2) y test de adquisición reversa (T3). Se realizó el análisis de ANOVA de una vía, seguidos de post hoc de Tukey según correspondía. Los datos de la figura muestran los datos de la media  $\pm$  el error estándar. Significancia estadística  $p > 0,05$ . El número de animales por cada grupo está indicado como  $n$ .



Asimismo, se analizó una comparación del tiempo acumulado de exploración del área de escape antes (T1) y después de la lesión (T2) y el tiempo acumulado de exploración luego de la adquisición reversa durante el período post lesión (T3). T1, T2 y T3 fueron analizados separadamente y comparados dentro de cada grupo utilizando una prueba de ANOVA de una vía seguido de un post hoc de Tukey.

El tiempo acumulado de exploración del área de escape en el grupo SHAM fue semejante en los tres tiempos ( $p > 0,05$ ). El grupo VEH presentó un mayor tiempo acumulado en la zona correcta en el primer test de adquisición (T1) que en el segundo (T2) ( $p < 0,0001$ ) con medias de 31,0 ( $\pm 2,0$ ) y 14,1 ( $\pm 2,7$ ), respectivamente. En el test reverso (T3) presentó una media de 24,3 ( $\pm 3,6$ ), que fue menor que en T1, aunque mayor que T2, y no presentó diferencia significativa con esas evaluaciones. El grupo MCH1 también mostró un mayor tiempo en T1 que en T2 ( $p < 0,0001$ ), con medias de 34,2 ( $\pm 4,0$ ) en T1 y 12,4 ( $\pm 2,7$ ) en T2, en el test reverso (T3) mostró mayor tiempo que T2 ( $p < 0,05$ ), con una media de 24,1 ( $\pm 3,2$ ) (**Figura 16**).

Los detalles de la media quedan descritos en la **Tabla 10**, junto a los resultados de ANOVA de una vía que comparó el desempeño de los grupos de tratamiento cada día de evaluación, sin encontrar diferencia significativa entre estos ( $p > 0,05$ ). En la **Tabla 11** se detallan la media y la ANOVA entre los días de evaluación de cada grupo.

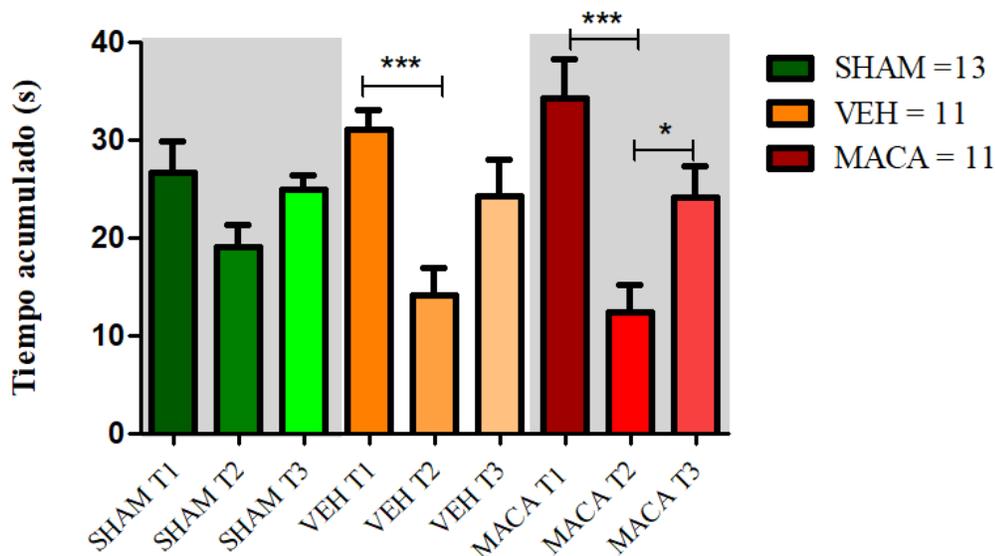
Estos resultados muestran que el tiempo de exploración acumulado del área de escape se reducen con el paso del tiempo desde el último entrenamiento (T1 vs T2) y que vuelve a incrementarse con un nuevo entrenamiento (T3). Esta capacidad está conservada en los animales MCAO, aunque con una importante reducción del tiempo de exploración entre T1 y T2, lo que sugiere que el deterioro motor y sensorial podría haber interferido en esta tarea. El incremento en el tiempo de exploración en T3 en los animales MCAO,



respecto a T2, sugiere que el aprendizaje y memoria espacial de estos animales estuvo conservado. Por otro lado, los resultados del tratamiento con MCH1 sugieren que la aplicación de MCH1 de dosis IP de 3mg/kg, aplicada 30 minutos previos a la MCAO y con tratamiento cada 24 horas durante 10 días, no tuvo ningún efecto sobre la memoria espacial. Pues si bien los resultados mostraron diferencias el día de evaluación T2, los otros días se observa un desempeño semejante entre los grupos, sugiriendo que la memoria espacial no fue afectada por la isquemia cerebral para la temporalidad en la que prueba fue realizada. Por lo que podría hipotetizarse que el daño se visualice de manera crónica o que las zonas que involucran esta función no se vieron directamente afectadas como para mediar alteración del aprendizaje y memoria espacial.

**Figura 16**

*Tiempo acumulado en Test de Barnes desempeño por grupos*



Nota: Promedio del desempeño de cada grupo en el test de adquisición (T1 y T2) y test de adquisición reversa (T3). Los datos de la figura muestran los datos de la media  $\pm$  el error estándar, sometidos a una ANOVA de una vía, seguidos de post hoc de Tukey según correspondía. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 = 11.



**Tabla 11**

*Test de Barnes - test de adquisición y reverso*

Test de adquisición		Grupo de tratamiento			
Día	Parámetro	SHAM	VEH	MCH1	F o K, p
T1	Tiempo acumulado	26,6 (± 3,1 /±11,2)	31,0 (±2,0/ ± 6,9)	34,2 (±4,0/ ±13,2)	F (2,32) =1,45, p>0,05
	Latencia primaria	7,3(2,7 - 8,7)	6,1 (2,1 - 16,8)	5,3 (3,0 -13,5)	K=0,02, p>0,05
T2	Tiempo acumulado	19,0 (±2,2/ ±8,2)	14,1(± 2,7/ ±9,2)	12,4 (± 2,7/ ± 9,0)	F (2,32) = 1,87, p>0,05
	Latencia primaria	13,0 (3,7 - 17,8)	23,6 (17,9 - 80,8) *	30,3 (22,0 - 90,0) *	K=9,50, p=0,0086
T3	Tiempo acumulado	24,9 (±1,5/ ±5,5)	24,3 (±3,6/ ±12,2)	24,1(±3,2/±10,6)	F (2, 32) =0,02, p>0,05
	Latencia primaria	5,2 (1,5 - 8,7)	7,5 (3,8 -7, 5)	3,1 (1,4 - 23,1)	K=1,92, p>0,05

Nota: Resumen del tiempo acumulado y latencia primaria en los test de adquisición y adquisición reversa, promedio de cada grupo. Datos paramétricos representados como: M ± ES / DS y los datos no paramétricos con los promedios intercuartil como: Md (IC25 - IC75), donde M=media, ES= error estándar, DS =desviación estándar, Md = mediana e IC (intercuartil). Según correspondía se realizó el análisis de ANOVA de una vía, seguidos de *post hoc* de Tukey o el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido por una prueba de comparación múltiple de Dunn. Significancia estadística cuando p < 0,05 \*diferente de Sham; \* o # p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001. El número de animales fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 =11.

**Tabla 12**

*Test de Barnes – desempeño por grupos*

Test de adquisición		Grupos de tratamiento		
Día	Parámetro	SHAM	VEH	MCH1
T1	(a) Tiempo acumulado	26,9 (± 3,1 /±11,2)	31,0 (±2,9/ ± 6,9)	34,2 (±4,0/ ±13,2)
T2	(b) Tiempo acumulado	19,7 (±2,2/ ±8,2)	14,1 (± 2,7/ ±9,2)	12,4 (± 2,7/ ± 9,0)



Test de adquisición		Grupos de tratamiento		
Día	Parámetro	SHAM	VEH	MCH1
T3 (c)	Tiempo acumulado	24,9 ( $\pm 1,5 / \pm 5,5$ )	24,3 ( $\pm 3,6 / \pm 12,2-9$ )	24,1 ( $\pm 3,2 / \pm 10,6$ )
		ANOVA de una vía (F), p	F (32) = 2,752, p > 0,05	F (32) = 8,439, p = 0,0012 ***(a - b)

Nota: Tiempo acumulado y latencia primaria en los test de adquisición y adquisición reversa, promedio de cada grupo. Datos paramétricos representados como:  $M \pm ES / DS$ , donde M=media, ES= error estándar y DS =desviación estándar. Se realizó el análisis de ANOVA de una vía, seguidos de post hoc de Tukey según correspondía. Significancia estadística cuando  $p < 0,05$ ; \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . El número de animales por cada grupo fue de SHAM = 13, VEH = 11 y MCH1 = 11.

#### 4.2 Resultados respecto al objetivo general

A partir de estos resultados vemos que la administración de macamida sintética 30 minutos previos a la MCAO y con tratamiento de dosis IP de 3mg/kg cada 24 horas durante 10 días, tiene un efecto neuroprotector en la reducción del área de infarto, así también mostró un ligero efecto en la conservación de la respuesta sensorial, pero no motora. Los animales expuestos a MCAO no mostraron deterioro de sus funciones cognitivas, como tampoco se observó algún efecto de la MCH1 en este nivel. El resumen del efecto neuroprotector de la variable independiente queda detallado en la **Tabla 13**, con los resultados obtenidos sobre las dimensiones de la variable dependiente, así mismo se indica el nivel de impacto encontrado.



**Tabla 13**

*Efecto agudo de MCH1 en las dimensiones de la variable dependiente.*

		Efecto neuroprotector			Impacto de MCH1(+)
Dimensiones	Indicadores	SHAM	VEH	MCH1	
Área de infarto	Área conservada	0,00 (0,00±0,00)	11,10 (1,76±4,32) ***	4,01 (0,52±1,28) */###	Positiva (p<0,001)
	Prueba de García modificada	9,0 (9,0 - 9,0)	7,0 (7,0 - 7,0) ***	8,0 (7,0 - 9,0) *	Neutral (p>0,05)
Respuesta sensorio - motora	Conservación de la función sensitiva	1,9 ± 0,3/ ±1,0	44,3 ±16,9/ ±56,1 **	15,8 ±2,5/ ±8,5	Tendencia positiva (p<0,05)
	Conservación de la función motora	5,7 ± 1,1/ 4,1	121,2 ± 18,6/ ±61,7 ****	129,5 ± 20,9/ 69,5 ****	Neutral (p>0,05)
	Prueba de retirada de cintas adhesivas	1,6 (1,0 - 2,8)	20,0 (14,6-63,6) ***	16,0 (7,6 – 21,6) **	Neutral (p>0,05)
	Prueba de caminata en malla	4,3 (2,8 -7,3)	143,7 (77,6 - 180) ***	180,0 (46,6-180,0) ***	Neutral (p>0,05)
Memoria espacial	Test de Barnes (tiempo acumulado)	24,9 (±1,5/ ±5,5)	24,3 (±3,6/ ±12,2)	24,1(±3,2/±10,6)	Neutral (p>0,05)
Aprendizaje espacial	Test de Barnes (latencia)	5,2 (1,5 - 8,7)	7,5 (3,8-7, 5)	3,1 (1,4-23,1)	Neutral (p>0,05)

Nota: Resumen basado en los resultados post isquemia del área de infarto del día 11 y de las pruebas realizadas el día 10, considerando la pata delantera contralateral en la prueba de retirada de cintas y caminata en malla. Se presentan los datos sham (SHAM) y vehículo (VEH). Significancia estadística cuando p < 0,05 \*diferente de Sham, diferente de vehículo; \* p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\* o ### p< 0,001. + Dirección del impacto del tratamiento con MCH1 respecto al efecto del grupo con tratamiento VEH, donde se considera positivo (mejora frente a VEH), tendencia positiva (no muestra diferencia frente al VEH ni SHAM y al día 3 mostró diferencia frente al VEH), VEH neutral (mantiene frente a VEH) y negativo (empeora frente a VEH).



## Capítulo V: Discusión

### 5.1 Descripción de los hallazgos más relevantes y significativos

La presente investigación tuvo como objetivo conocer el efecto neuroprotector de MCH1 en una isquemia cerebral focal, usando un modelo animal de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), para evaluar este efecto en los distintos niveles de estudio del sistema nervioso. Es así que esta descripción da inicio con la evaluación de la conservación morfológica, donde se encontró que el grupo VEH mostró que las áreas más afectadas fueron del córtex motor primaria y secundario y el córtex somatosensorial de patas delanteras y trasera, siendo áreas que el grupo tratado con MCH1 presentó un mayor nivel de conservación de área cerebral.

El siguiente nivel de análisis se dio en la respuesta neurológica, donde se evaluó el desempeño en la respuesta general de orientación, nivel de alerta y exploración, así como de la respuesta sensitiva y motora. Los animales MCAO mostraron un importante déficit sensorio - motor al día 3, que estuvo más marcado en la pata delantera contralateral y ligeramente en la pata delantera ipsilateral, el impacto en la función sensorial al día 3 reveló un efecto protector MCH1. Al día 10 post lesión, el déficit sensorio - motor en la pata delantera contralateral se mantuvo sin mejora, pero no se observó más este déficit en la pata delantera ipsilateral. El tratamiento con MCH1 no mostró efecto en el alivio de déficit sensorio-motor medido mediante las escalas neurológicas de García original o modificada, tampoco en el test de caminata en malla.

El análisis separado del desempeño en el test de retirada de cinta el día 3 post lesión mostró un ligero efecto de la MCH1 en el alivio del déficit motor de la pata delantera ipsilateral, pero no contralateral. Al día 10 post lesión, el déficit sensorial y motor contralateral de los animales MCAO se mantuvo y no se observó efecto del tratamiento con



MCH1. La respuesta de sensibilidad a la cinta adhesiva de los animales MCAO tiene una mejora entre el día 3 y 10 post lesión, lo cual sugiere un proceso de recuperación sensorial natural de la lesión con el paso del tiempo, el cual parece haber sido ligeramente mejorada por el tratamiento de MCH1. Esta recuperación natural no se observó en la función motora medida con la latencia para retirar la cinta de la pata contralateral.

Asimismo, en el análisis separado del desempeño en el test de caminata en malla al día 3 post lesión, los animales MCAO mostraron una deficiencia motora importante restringida al miembro superior contralateral a la lesión, la cual se mantiene sin mejora del día 3 al 10 post lesión, sobre el cual no se observa efecto del tratamiento con MCH1. Al día 3 post lesión, los animales MCAO también presentan déficit motor en la pata delantera ipsilateral a la lesión, el cual parece haber sido ligeramente aliviada por el tratamiento con MCH1. Sin embargo, la lesión en la pata ipsilateral parece ser un efecto agudo de MCAO, pues el déficit motor observado el día 3 no fue más observado el día 10, donde la función motora de la pata ipsilateral de los tres grupos fue semejante.

El próximo nivel de evaluación fue respecto a la función cognitiva de aprendizaje y memoria espacial, donde no se observó diferencia entre los grupos de tratamiento y los tres grupos presentaron un desempeño semejante en su curva de aprendizaje espacial, así como en la conservación de memoria espacial. Algunas tendencias diferenciales estarían atribuidas a la respuesta sensorio-motora que afecta el desempeño del animal, en cuanto a su desplazamiento por el laberinto, dado que durante la evaluación los animales los tres grupos mostraron latencias semejantes para llegar a la caja de escape, un número de errores similar antes de llegar a la zona correcta y un tiempo semejante de permanencia en dicha zona, mostrando la ausencia de déficit cognitivo, que haya podido ser detectado por medio del test de Barnes.



## 5.2 Limitaciones del estudio

El tamaño de área y zona de infarto puede ser influenciado por varios factores como pequeños detalles en la técnica de oclusión, la temperatura, la edad, la cepa utilizada, las ramificaciones de vasos sanguíneos propia de cada animal (Reglodi et. al. 2003; Fluri et. al, 2015). Además, estudios recientes consideran que los animales habituados a condiciones de altura presentarían incluso un nivel de protección ante enfermedades obstructivas como la isquemia (Faber et. al, 2020). Por lo que la reproductibilidad exacta del modelo de MCAO entre los animales significa un reto para este tipo de investigaciones, más aún en la condición de altura en la que se realizó.

La mortalidad obtenida en este estudio fue mayor a la reportada en otros estudios realizados a nivel del mar, donde obtenían porcentajes entre 0, 7 ó 23% (Menzies et. al; Schomacher, 2008; Caltana et. al, 2015). Sin embargo, estudios con la aplicación de este modelo de isquemia en condiciones de altura, mostraron que los grupos en condición de altura presentaban mayor mortalidad que el grupo a nivel del mar con un promedio de 27% de mortalidad, aunque los animales que sobrevivieron presentaron una menor afectación por la isquemia que el otro grupo (Faber et. al, 2021; Zhu et. al, 2021). La presente investigación obtuvo una mortalidad de aproximada del 45% en los grupos donde se indujo la isquemia (VEH y MCH1). Así mismo, en la etapa de estandarización del modelo de isquemia, se encontraron dificultades para definir el tiempo de oclusión por obtener un 50% de mortalidad y al mismo tiempo encontrar animales con porcentajes de daño isquémico menor al esperado en las sobrevivientes.

Las funciones cognitivas no fueron afectadas como otros modelos de isquemia con el mismo o menor tiempo de oclusión reportaron (Lu et. al, 2015; Taboada, 2016), lo cual no permitió analizar el efecto neuroprotector de las macamidas sintéticas a este nivel.



### 5.3 Comparación crítica con la literatura existente

La enfermedad cerebro vascular es una de las principales causas de muerte a nivel mundial y una de las principales causas de discapacidad en el mundo (Fluri et. al, 2015; Kuriakose & Xiao, 2020), por ello la investigación en los tratamientos terapéuticos o neuroprotectores para alivio de sus síntomas o secuelas (trastornos sensitivos, motores o cognitivos) sigue siendo de interés (Castillo, 2001; Lim & Alexander, 2009). La neuroprotección en la isquemia hace referencia a la conservación de la materia cerebral comprometida en el ACVi, que a su vez pueda conllevar a la conservación de las funciones cerebrales afectadas (Chamorro et. al, 2020).

Estudios previos *in vitro* e *in vivo* en modelos de isquemia mostraron que el extracto pentánico de maca tenía un efecto neuroprotector dependiendo de la dosis. Así mismo, mostraron el efecto neuroprotector del extracto pentánico de maca en la conservación de áreas cerebrales con dosis entre 3 a 5mg/kg en ratas inducidas a ACVi (Pino et. al, 2010; Cunhas, 2015; Taboada, 2016). Estos primeros hallazgos con uso extracto pentánico de maca, que contiene múltiples macamidas, fueron precedentes para investigaciones con macamidas aislada, donde la macamida aislada N-Bencil-(9Z,12Z)-octadecadienamida mostró neuroprotección a nivel celular en un modelo *in vitro* de neurotoxicidad inducida por  $\beta$ -amiloide 25-35 (Vera, 2018); también se reportó en un modelo *in vivo*, la macamida N-benzyl eicosapentaenamida mostró efecto en ratones con daño cerebral por hipoxia isquémica neonatal, en términos de neuroprotección celular, conservación morfológica y alivio del déficit neurológico (Jiao, et. al, 2021). Mostrando que la macamida estaría actuando directamente en la conservación de células neuronales, y a su vez en la conservación de funciones neurológicas relacionadas a las áreas de daño.



Investigaciones que usaron el sistema endocannabinoide como vía neuroprotectora para el ACVi han mostrado que una dosis de 10mg/kg IP de anandamida (AEA) o una dosis 30mg/kg IP de palmitoiletanolamida (PEA) a los 30 minutos de una MCAO de 90 minutos de duración en ratas, tuvieron efecto protector respecto a la extensión del área de infarto en un máximo del 26% y 35% respectivamente. Además, reportaron que independientemente de la dosis o el agente de tratamiento, las áreas corticales fueron más afectadas que las subcorticales (Schomacher, 2008). En comparación a estos hallazgos los resultados con macamida aislada MCH1, en dosis IP de 3mg/kg, aplicada 30 minutos antes del MCAO y con 10 días de tratamiento tuvo un efecto protector del 63,85%.

La macamida MCH1 que fue usada en este estudio actúa en el sistema endocannabinoide, específicamente inhibe la actividad de la enzima FAAH que degrada el metabolismo de la anandamida (AEA) (Vu, 2012). La anandamida es uno de los ligandos que tienen más afinidad para unirse a los receptores endocannabinoides y media la neuromodulación de los sistemas de neurotransmisión de glutamato y GABA en muchos circuitos cerebrales (Pertwee, 2015). La inhibición de la enzima FAAH por la acción de MCH1 resultaría en un incremento de la disponibilidad de la anandamida en el sistema nervioso y, esto a su vez, permitiría mantener la neuromodulación de sistemas de neurotransmisión (Wu et. al, 2013). De este modo, el incremento de los niveles de endocannabinoides mediante agentes farmacológicos sintéticos como las macamidas es considerada una potencial alternativa neuroprotectora para isquemia focal y global (Almukadi et al., 2013); y los resultados, utilizando macamida sintética MCH1 muestran la protección morfológica por medio de la reducción del área infartada, que podría denominar al MCH1 con un efecto promisor neuroprotector.



Las áreas con mayor porcentaje de daño en el grupo VEH fueron zonas sensorio – motoras, en el corte 2 el córtex motor primario (M1) y secundario (M2), en el corte 3 en córtex somatosensorial primario de pata delantera (S1FL), de mandíbula (S1J), superficie oral (S1JO) y el núcleo estriado (CPU); y el corte 4 las zonas de córtex somatosensorial primario de pata trasera (S1HL) y córtex somatosensorial secundario (S2). Dichas regiones también fueron reportadas afectadas en otras investigaciones que siguieron el modelo MCAO (Wahl et. al., 1992; Popp et. al., 2009; Yeh et. al., 2018). Es propio del modelo MCAO con oclusión transitoria que exista recuperación en la zona core de la isquemia y en la zona de penumbra (Fluri et. al, 2015), es así que, si bien existe recuperación natural, esta se encuentra a la vez sujeta a la magnitud del daño inicial y los tratamientos neuroprotectores buscan limitar este daño primigenio (Castillo, 2001). A partir de la evaluación sensorio-motora, en este estudio se pudo evidenciar el efecto de la recuperación natural, así como un menor impacto en la afectación sensitiva del grupo MCH1 al día 3 de evaluación, lo que se podría indicar que el tratamiento con MCH1 pudo ser un agente neuroprotector en la etapa aguda de la isquemia en las zonas sensorio-motoras y áreas más visiblemente conservadas al día 11.

En un estudio de neuroprotección, Jiao y colaboradores (2021) utilizaron un modelo de animales neonatos inducidos a isquemia hipóxica, y les aplicaron tratamiento con una macamida sintética aislada “NB-EPA”, utilizando una dosis inicial en la cirugía de oclusión y 3 días posteriores; y encontraron que el grupo tratado con dicha macamida sintética obtuvo una mejor conservación del área cerebral afectada. Reportaron que el daño medio del vehículo fue 30,01% y el del grupo tratado con la macamida “NB-EPA” de un 11,13%, siendo el 37,08% de protección respecto al vehículo, siendo semejante al nivel de protección del presente estudio, donde el tratamiento con MCH1 tuvo un 36,16% de



protección respecto al grupo VEH. Si bien este estudio es realizado en animales más jóvenes, el fenómeno donde se aplica el tratamiento macamida sintética aislada es semejante en la naturaleza de privación de glucosa y oxígeno en el cerebro por medio de la interrupción del flujo sanguíneo. Al respecto de la evaluación sensorio – motora de las patas delanteras, indicaron que el grupo vehículo presentó alteraciones en la respuesta neurológica respecto a la propiocepción, respuesta refleja y en fuerza, e indicaron que estas fueron mejoradas en el grupo tratado con la macamida “NB-EPA” al día 1, 3 y 7 de evaluación. En este estudio, el tratamiento con MCH1 no mostró diferencia significativa en la evaluación neurológica aplicada en el día 3, ni en el día 10; sin embargo, la prueba de retirada de cintas reveló una mejora en la sensibilidad de pata delantera contralateral al día 3 de evaluación respecto al grupo VEH, más no mostró mayor efecto el día 10.

Un estudio realizado por Encarnación y colaboradores (2011), utilizó un modelo de MCAO transitoria de 60 y 75 minutos en ratas adultas Wistar (W) y Sprague Dawley (SD), donde midieron la respuesta neurológica semanalmente, los 90 días posteriores a la oclusión. En sus resultados reportaron la variación del tiempo de infarto de 60 a 75 minutos, incrementó el volumen de infarto de la cepa SD, mas no W. El déficit a largo plazo inducido por la isquemia solo fue detectado con una prueba de simetría de patas, la puntuación neurológica de García y una escala neurológica de 28 puntos, esta última incluyó la caminata en círculos. El análisis motor fue a partir de la prueba de deterioro en la marcha y la prueba de caminata en malla, que mostraron déficits a corto plazo de las patas contralaterales, con recuperación dentro de las dos semanas posteriores a la MCAO, incluida la intensidad, la longitud de la zancada, índice de soporte, ciclo de trabajo y el momento de la colocación. Indicaron que el daño a nivel motor es significativo hasta los 14



días posteriores a la oclusión y la disminución en la intensidad de la caminata indicaría daño en la corteza motora.

Al ser el mismo modelo de oclusión, este dato podría indicar que aún hay afectación propia de la isquemia, y estaría comprometiendo la corteza motora. El presente estudio encontró que la función motora fue la más afectada por la oclusión, al evidenciar afectación desde el día 3 y sin mostrar recuperación al día 10 de tratamiento. También se evaluó a partir de la caminata circular como parte de la evaluación neurológica modificada, este comportamiento es signo de la afectación por la isquemia causado por la debilidad en las patas, ha sido considerado un comportamiento correlacionado positivamente a la gravedad de lesión y además ha sido reportado en animales con lesión isquémica en la corteza motora primaria (M1) o en la cápsula interna (Longa, 1989; Reglodi et. al. 2003; Yeh et. al, 2018). El día 3 de evaluación el 90,9% de los animales del grupo VEH presentó el comportamiento de caminata circular, mientras que en el grupo MCH1, un 54,5% de animales presentó este comportamiento. Para el décimo día de evaluación, el porcentaje de animales con caminata circular en el grupo VEH se redujo a 72,7%, mientras que en el grupo MCH1, se redujo a 36,3%. Estos datos podrían ser un indicador de alguna recuperación en la fuerza de las patas que mejoraría la intensidad motora del grupo tratado con MCH1, es probable que el test de retirada de cintas no haya detectado este factor puesto que la ejecución de la tarea involucra no solo el trabajo de las patas sino también de zonas sensitivas y motoras de mandíbula y zona oral; y la prueba de caminata en malla considera aspectos motores como coordinación.

Algunas investigaciones reportan que el modelo de oclusión de la arteria cerebral media mostró daño a nivel hipocampal y las evaluaciones en la etapa aguda de la isquemia reportaron deterioro en algunos procesos cognitivos como memoria aversiva (Wahl et. al,



1992; Taboada, 2016). Respecto a la memoria y aprendizaje espacial Lu y colaboradores (2016) aplicaron un modelo de oclusión bilateral de la arteria cerebral media en ratas y exploraron estos procesos a los 10 días de la oclusión bilateral utilizando el laberinto de Barnes. Reportaron que encontraron déficit tanto en memoria como aprendizaje espacial, al realizar 3 días de entrenamiento, 7 posteriores a la inducción de isquemia global. Según señalan los autores, este modelo de isquemia simula una isquemia cardiaca, que por la interrupción sanguínea conlleva a una isquemia global del cerebro, y no una isquemia focal; siendo que este modelo ha mostrado afectación bilateral hipocampal a los 20 minutos de hipoxia en estudios de alta resolución de resonancia magnética. En el presente estudio, algunos animales tuvieron daño en zonas hipocampales o aledañas del lado afectado por la isquemia, que podrían suponer alteración de la memoria o aprendizaje espacial; sin embargo, los animales ACV no mostraron déficit de estas funciones cognitivas. Por lo que, una posible explicación de no encontrar déficit agudo en memoria o aprendizaje espacial sería que el modelo aplicado tuvo una afectación hipocampal unilateral, cuando aparentemente el impacto en ambos hipocampos sería condición para encontrar alteración de estos procesos en una fase aguda del daño.

Si bien estos estudios tuvieron énfasis en la afectación aguda, cabe señalar que otras investigaciones consideran un tiempo de 6 a más semanas posteriores a la isquemia, para realizar la evaluación de memoria espacial (Okada, 1995; Panta, 2020). Es reportado un alto porcentaje de pacientes que presentan daño cognitivo a los 6 meses después de tener el ACV, un fenómeno que también ocurre con los traumatismos cerebrales (Jacquin et. al, 2014; Mellon et. al, 2015; Hausser et. al, 2018). De este modo, algunas explicaciones para no haber encontrado alteración en el desempeño de la memoria y aprendizaje espacial podrían estar relacionada a que el daño isquémico no se dio en zonas que afecten estas



funciones, o que los síntomas agudos del ACVi aún no se presentan a este nivel de evaluación, aunque podrían desarrollarse con el tiempo. Futuros estudios podrán verificar si el daño hipocampal bilateral en etapas agudas o el daño hipocampal unilateral en etapas crónicas representarían alteraciones en memoria y/o aprendizaje espacial.

#### **5.4 Implicancias del estudio**

Esta investigación ayuda a conocer el nivel de neuroprotección de la macamida sintética MCH1 en un modelo de isquemia inducida por MCAO de 75 minutos. Este estudio queda como precedente para conocer el efecto de esta macamida aislada en específico y poder compararla con otras en adelante. Así mismo, permitió identificar la neuroprotección a nivel morfológico y un potencial efecto en el desempeño neurológico.

Así mismo, resulta relevante ver las distinciones de la aplicación de este modelo en un laboratorio 3299 m.s.n.m. El protocolo aquí presentado fue estandarizado en un tiempo de reperfusión pasados los 75 minutos, considerando tener la menor mortalidad posible (>50%), aunque manteniendo una lesión que permita evaluar los objetivos de neuroprotección planteados (10% <). En esta investigación el grupo ACV- VEH obtuvo un 42,30% de mortalidad y una media de 11,10 % de lesión isquémica. Estos datos quedan como precedente para investigaciones semejantes y más aún en laboratorios con características similares donde busque ser replicado un modelo de MCAO.

Un aporte de esta investigación estaría en el diseño experimental del test de Barnes, el cual fue estandarizado para medir la función inicial de memoria y aprendizaje espacial de cada animal previa a la lesión y contrastar estos procesos post lesión, identificando los cambios a consecuencia de la lesión. Así mismo, brinda la posibilidad de evaluar alteraciones en la memoria retrograda y anterógrada. Si bien, en esta investigación no se encontraron alteraciones en memoria y aprendizaje espacial que permitan hacer esta



comparación, los hallazgos muestran que sería de interés la exploración a largo plazo para este modelo, al saber que muchas secuelas del ACVi son también crónicas.

Para realizar esta investigación se tuvieron en cuenta las recomendaciones brindadas por la mesa redonda de la industria académica de terapia de accidente cerebrovascular (STAIR, por sus siglas en inglés) que procuran incrementar las posibilidades de trasladar las pruebas pre-clínicas a modelos clínicos (Fisher et. al, 2009). Por lo que, para esta investigación se consideró en la aplicación de la técnica de inducción, la estandarización de la dosis y vía utilizada, el protocolo de evaluaciones y la aplicación de doble ciego del proceso.

Se conoce que la vía de acción de las macamidas está relacionada al sistema endocannabinoide, este y otros estudios corroboran un nivel de neuroprotección en modelos de ACVi usando extracto pentánico o macamidas aisladas (Pino-Figueroa et al., 2010; Almukadi et al., 2013; Alasmari et. al, 2019; Jiao, et. al, 2021), por lo que la presente investigación estaría sumando a los reportes que señalan esta vía de acción potencial para buscar estrategias terapéuticas neuroprotectoras.



## Conclusiones

**Primera:** La macamida sintética MCH1 tiene una tendencia positiva neuroprotectora a nivel morfológico en un modelo animal de accidente cerebrovascular isquémico focal con dosis intraperitoneal de 3 mg/kg aplicada 30 minutos antes de la oclusión y con tratamiento de la misma dosis por 10 días.

**Segunda:** La macamida sintética MCH1 mostró una tendencia positiva de neuroprotección respecto a la recuperación de la simetría de patas a los 10 días de tratamiento y en la conservación sensitiva del lado contralateral y motora del lado ipsilateral.

**Tercera:** El modelo MCAO no indujo alteración en la memoria espacial de los animales y el tratamiento con macamida sintética MCH1 no mostró efecto de esta función cognitiva.

**Cuarta:** El modelo MCAO no indujo alteración en el aprendizaje espacial de los animales y el tratamiento con macamida sintética MCH1 no mostró efecto de esta función cognitiva.

**Quinta:** Este estudio sugiere que el sistema endocannabinoide podría estar relacionado con la neuroprotección de daño inducido por isquemia, específicamente en el incremento del tono endocannabinoide inducido por la acción de MCH1.



## Recomendaciones

**Primera:** La presente investigación solo analizó una de las múltiples macamidas presentes en la maca, por lo que se sugiere explorar las otras macamidas en este mismo modelo, y así poder contrastar los posibles efectos de la administración de macamidas o del extracto pentánico de maca.

**Segunda:** Se sugiere explorar el efecto de las macamidas en las funciones cognitivas de memoria y aprendizaje con otras pruebas o diseños experimentales, puesto que anteriores estudios muestran que el extracto pentánico de maca podría mejorar el desempeño de estas funciones. Así mismo, hacer esta exploración en las secuelas del ACVi a largo plazo.

**Tercera:** La presente investigación solo utilizó ratas machos, sin embargo, sería de sumo interés replicar o añadir en futuras investigaciones de ACVi en modelos de ratas hembras. Puesto que los cambios hormonales propios de estos modelos dan resultados distintos y es conocido que muchas drogas no consideran esta importante variable para llevar la investigación a fases clínicas.

**Cuarta:** Usar el protocolo de test de Barnes presentado en el estudio para explorar funciones cognitivas relacionadas a la memoria espacial en esta u otras patologías como Alzheimer.

**Quinta:** Se sugiere incluir en el protocolo de inclusión – exclusión con técnicas que permitan homogeneizar la muestra, como el uso de tecnología de imagen computarizada, que a su vez permita conocer el porcentaje de daño a las 24 horas de la lesión y contrastar la evolución en el tiempo. Otro tipo de pruebas podrían ser evaluaciones neurológicas de las primeras 24 horas post isquemia.



### Referencias bibliográficas

- Aguilar, L., Espinoza, G., Oruro, E. y Carrión, D. (2010). Aprendizaje, memoria y neuroplasticidad. *Temática Psicológica*, 6(6), 7-14.  
<https://doi.org/10.33539/tematpsicol.2010.n6.856>
- Aguirre, E. (2015). La función del hipocampo en el procesamiento de la memoria y su deterioro durante el envejecimiento. *Revista mexicana de neurociencia*, 16(4), 21 - 30. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmexneu/rmn-2015/rmn154c.pdf>
- Al-Qazzaz, N, Ali, S, Ahmad, S, Islam, S., y Mohamad, K. (2014). Cognitive impairment and memory dysfunction after a stroke diagnosis: a post-stroke memory assessment. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 10, 1677-1691. doi: 10.2147/ndt.s67184
- Alarcon, C, Diaz, M, E, Vera, V, Alva, C, y Metcalf, T. (2019). A Bibliometric Analysis of the Latin American Research on Stroke 2003–2017. *World Neurosurgery*, 129, e545-e554. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.05.212>
- Alarcón, D. (2016). *Efecto modulador de la maca (Lepidium meyenii) sobre el sistema endocannabinoide: estudios en humanos y animales*. (Licenciado en ciencias con mención en biología), Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima - Perú.
- Alasmari, M., Böhlke, M., Kelley, C., Maher, T., y Pino-Figueroa, A. (2019). Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) by Macamides. 56(3), 1770-1781. doi: 10.1007/s12035-018-1115-8
- Alger, B. (2012). Endocannabinoids at the synapse a decade after the dies mirabilis (29 March 2001): what we still do not know. *J Physiol*, 590(10), 2203-2212. doi: 10.1113/jphysiol.2011.220855
- Almukadi, H., Wu, H., Böhlke, M., Kelley, C. J., Maher, T. J., y Pino-Figueroa, A. (2013). The macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide is a time-dependent fatty acid



amide hydrolase (FAAH) inhibitor. *Mol Neurobiol*, 48(2), 333-339. doi:

10.1007/s12035-013-8499-2

Alvarado, A., Vila, J., Stremplere, E. y López, L. (2011). Aprendizaje espacial y recuperación espontánea en humanos. *Revista mexicana de análisis de la conducta*, 37(2), 139-153. doi: 10.5514/rmac.v37.i2.26144

Amici, S (2012). Memory dysfunction. *Front Neurol Neurosci*. 30, 54–56. doi:

10.1159/000333409

American Psychological Association (2020). Publication manual of the American Psychological Association (7th ed.). <https://doi.org/10.1037/0000165-000>

Arango, C., Escobar-Betancourt, M., Cardona-Gómez, G. P., y Pimienta-Jiménez, H. (2004). Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice. *Rev Neurol*, 39(2), 156-165.

Arauz, A. y Ruíz, A. (2012). Enfermedad vascular cerebral. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 55, 11-21.

Ardilla, A. y Roselli, M. (2007). *Neuropsicología clínica* (Manual Moderno Ed. 1ra ed.). México.

Arias, R, Toma, J, Aguilar, E, Ramírez, E, Shimabuku, R. y Suárez, S. (2012).

Neuroprotección del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Satureja brevicalyx* ‘wayra muña’ en un modelo animal de hiperoxia e hipoxia-isquemia. *Anales de la Facultad de Medicina*, 73, 215-220.

Atamari, N, Alva, N, Vera, V y Taype, A. (2019). Tendencia de mortalidad por enfermedad cerebrovascular registrada por el Ministerio de Salud de Perú, 2005-2015. *Neurol Arg*, 11(4):202–209. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuarg.2019.07.001>



- Barnes, C. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 93(1), 74–104. doi:10.1037/h0077579
- Barnes, C. (1988). Spatial learning and memory processes: the search for their neurobiological mechanisms in the rat. *Trends in Neurosciences*, 11(4), 163–169. doi:10.1016/0166-2236(88)90143-9
- Brailowsky, S. (2002). *Las sustancias de los sueños*. Ciudad de México: Fondo de cultura económica.
- Butler, G., y MacManus, F. (2014). *Psychology. A very short introduction*. . United Kingdom: Oxford University Press.
- Caltana, L., Saez, T. M., Aronne, M. P., y Brusco, A. (2015). Cannabinoid receptor type 1 agonist ACEA improves motor recovery and protects neurons in ischemic stroke in mice. *Journal of Neurochemistry*, 135(3), 616–629. doi:10.1111/jnc.13288
- Carrillo, P. (2010). Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Primera parte: Historia, taxonomía de la memoria, sistemas de memoria de largo plazo: la memoria semántica. *Salud mental*, 33, 85-93.
- Castañeda, A, Beltrán, G, Casma, R., Ruiz, P y Málaga, G. (2011). Registro de pacientes con accidente cerebro vascular en un hospital público del Perú, 2000-2009. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 28, 623-627.
- Castillo, J (2001). Luces y sombras de la neuroprotección en la isquemia cerebral. *Revista de neuro-psiquiatria*, 64(Dic), 354-381. doi:  
<https://doi.org/10.20453/rnp.v64i4.1499>
- Chun, L y Michael, A (2009). Stroke and episodic memory disorders. *Neuropsychologia*, 47, 3045–3058. doi:10.1016/j.neuropsychologia.2009.08.002



- Chao, O., Pum, M. y Huston, J. (2012). The grid-walking test: assessment of sensorimotor deficits after moderate or severe dopamine depletion by 6-hydroxydopamine lesions in the dorsal striatum and medial forebrain bundle. *Neuroscience* (202) pp. 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.016>
- Cunhas, Ivone Farias. (2015). *Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato pentanólico do *Lepidium meyenii* (maca) em modelo animal experimental de acidente vascular cerebral isquêmico focal*. (Mestra em Ciências da Saúde), Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Sao Paulo.
- Davalos, L. y Málaga, G. (2014). El accidente cerebrovascular en el Perú: una enfermedad prevalente olvidada y desatendida. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 31, 400-401.
- Domjam, M. (2010). *Principios del aprendizaje y la conducta* (6ta ed.). Wadsworth Cengage Learning.
- Eichenbaum, H. (2017). On the integration of space, time, and memory. *Neuron*, 95(5), 1007–1018. doi: 10.1016/j.neuron.2017.06.036.
- Encarnacion, A., Horie, N., Keren-Gill, H., Bliss, T. M., Steinberg, G. y Shamloo, M. (2011). Long-term behavioral assessment of function in an experimental model for ischemic stroke. *Journal of Neuroscience Methods*, 196(2), 247–257. Doi: 10.1016/j.jneumeth.2011.01.01
- Faber, J., Storz, J., Cheviron, Z. y Zhang, H. (2020). High-altitude rodents have abundant collaterals that protect against tissue injury after cerebral, coronary and peripheral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 41(4), 731 – 744. doi:10.1177/0271678x20942609



- Ferri, C., Schoenborn, C., Kalra, L., Acosta, D., Guerra, M., Huang, Y. y Prince, M. J. (2011). Prevalence of stroke and related burden among older people living in Latin America, India and China. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 82(10), 1074-1082. doi: 10.1136/jnnp.2010.234153
- Fluri, F., Kleinschnitz, C. y Schuhmann, M. (2015). Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. *Drug Design, Development and Therapy*, 3445. doi:10.2147/dddt.s56071
- Fisher, M., Feuerstein, G., Howells, D., Hurn, P., Kent, T. y Savitz, S. (2009). Update of the Stroke Therapy Academic Industry Roundtable Preclinical Recommendations. *Stroke*, 40(6), 2244–2250. doi:10.1161/strokeaha.108.541128
- García, C, Martínez, A, García, V, Ricaurte, A, Torres, I, y Coral, J. (2019). Actualización en diagnóstico y tratamiento del ataque cerebrovascular isquémico agudo. *Universitas Medica*, 60, 41-57.
- García, J, Wagnes, S, Liu, K y Hu, X (1995). Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke*, 26, 627 – 635. doi: 10.1161/01.str.26.4.627
- Gonzales, G. (2012). Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 193496. doi: 10.1155/2012/193496
- Grotenhermen, F. (2006). Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide *Cannabinoids*, 1(1), 10-14.
- Grysiewicz, R, Thomas, K. y Pandey, D. (2008). Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol Clin*, 26(4), 871-895, vii. doi: 10.1016/j.ncl.2008.07.003



- Haldal, S., Beary, J., Premkumar, N., George, P. y Newey, C. (2018). Acute ischemic stroke management review for the hospitalist. *American Journal of Hospital Medicine*, 2, 16.
- Harding, S. y Feldman, D. (2018). Somatosensory maps. *Handb Clin Neurol*, 151, 73–102. doi:10.1016/b978-0-444-63622-5.00004-8
- Hausser, N., Johnson, K., Parsley, M., Guptarak, J., Spratt, H. y Sell, S. (2018). Detecting behavioral deficits in rats after traumatic brain injury. *Journal of Visualized Experiments*, (131). doi:10.3791/56044
- Hebb, D (1949). The organization of behavior. A neuropsychological theory. Lawrence Erlbaum Associates. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. México DF: McGrawHill.
- Hernández, T y Schallert, T. (1988). Seizures and recovery from experimental brain damage. *Exp Neurol*, 102, 318-24. doi:
- Instituto de Evaluación de Tecnologías en Salud. (2018). Guía de práctica clínica para el diagnóstico y tratamiento de la etapa aguda del ataque cerebrovascular isquémico. Lima, Perú: ESSALUD.
- Jacquin, A., Biquet, C., Rouaud, O., Graule-Petot, A., Daubail, B., Osseby, G. y Béjot, Y. (2014). Post-Stroke Cognitive impairment: high prevalence and determining factors in a cohort of mild stroke. *Journal of Alzheimer's Disease*, 40(4), 1029–1038. doi:10.3233/jad-131580
- Jaillard, A., Hommel, M. y Mazetti, P. (1995). Prevalence of stroke at high altitude (3380 m) in Cuzco, a town of Peru. A population-based study. *Stroke*, 26(4), 562-568. doi: 10.1161/01.str.26.4.562



- Jiao, M., Dong, Q., Zhang, Y., Lin, M., Zhou, W., Liu, T y Yin, H. (2021). Neuroprotection of N-benzyl eicosapentaenamide in neonatal mice following hypoxic–ischemic Brain Injury. *Molecules*, 26(11), 3108. doi:10.3390/molecules26113108
- Jokinen, H; Melkas, S, Ylikoski, R Pohjasvaara, T, Kaste, M, Erkinjuntti, T. y Hietanen, M (2015). Post-stroke cognitive impairment is common even after successful clinical recovery. *European Journal of Neurology*, 22,1288–1294. doi:10.1111/ene.12743
- Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, T., Siegelbaum, S. y Hudspeth, A. (2013). *Principles of neural science*. McGrawHill.
- Kapadia, M., Xu, J., y Sakic, B. (2016). The water maze paradigm in experimental studies of chronic cognitive disorders: Theory, protocols, analysis, and inference. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 68, 195–217. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.05.0
- Kaur, H., Prakash, A. y Medhi, B. (2013). Drug therapy in stroke: from preclinical to clinical studies. *Pharmacology*, 92(5-6), 324-334. doi: 10.1159/000356320
- Kay, D. y Kibble, J. (2016). Learning theories 101: application to everyday teaching and scholarship. *Adv Physiol Educ*, 40(1), 17-25. doi: 10.1152/advan.00132.2015
- Kessels, R, de Hann, E, Kappelle, L. y Postma, A. (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Research Reviews*, 35, 295–303. doi: 10.1016/s0165-0173(01)00058-3
- Koizumi, J, Yoshida, Y, Nakazawa, T, y Ooneda, G. (1986). Experimental studies of ischemic brain edema. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Nosotchu*, 8(1), 1-8. doi: 10.3995/jstroke.8.1



- Kuriakose, D. y Xiao, Z. (2020). Pathophysiology and Treatment of Stroke: Present Status and Future Perspective. *Int. J. Mol. Sci.*, 21, 7609. doi:10.3390/ijms21207609
- Leciñana, M. (2012). Fisiopatología de la isquemia cerebral (pp. 5 - 17). Colombia.
- Longa, E, Weinstein, P, Carlson, S. y Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20(1), 84-91. doi: 10.1161/01.str.20.1.84
- Lugtmeijer, S, Lammers, N, de Haan, E, de Leeuw, F. y Kessels, R (2021). Post-Stroke Working Memory Dysfunction: A Meta-Analysis and Systematic Review. *Neuropsychology Review*, 31, 202–219. doi: <https://doi.org/10.1007/s11065-020-09462-4>
- Lim, C., y Alexander, M. P. (2009). Stroke and episodic memory disorders. *Neuropsychologia*, 47(14), 3045–3058. doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2009.08.002
- Lu, Q., Tucker, D., Dong, Y., Zhao, N. y Zhang, Q. (2015). Neuroprotective and Functional Improvement Effects of Methylene Blue in Global Cerebral Ischemia. *Molecular Neurobiology*, 53(8), 5344–5355. doi:10.1007/s12035-015-9455-0
- Martínez, J., García, L, Hernández, M. y Aranda-Abreu, G. (2015). Efectos sobre la locomoción y la memoria de 2 modelos de hipoperfusión cerebral en ratas Wistar macho. *Neurología*, 30(7), 407-415. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2014.03.001>
- Medina, A. y Escobar, M. (2002). Sistema glutamatérgico, primera parte: Sinaptología, homeostasis y muerte celular. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 31, 193-218.
- Mellon, L; Brewer, L; Hall, P; Horgan, F; Williams, D. y Hickey, A. (2015). Cognitive impairment six months after ischaemic stroke: a profile from the ASPIRE-S study. *BMC Neurology*, 15(1), 31-40. doi:10.1186/s12883-015-0288-2



- Menzies, S., Hoff, J. y Betz, A. (1992). Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*, 31(1):100-6. doi: 10.1227/00006123-199207000-00014
- Mesa, P. y Rodriguez, J. (2016). *Manual de Psicopatología General* Madrid: Pirámide.
- Miler, B (2005). The medial temporal lobe amnesic syndrome. *Psychiatr Clin N Am* , 28, 599–611.
- Moretti, A, Ferrari, F. y Villa, R. (2015). Neuroprotection for ischaemic stroke: Current status and challenges. *Pharmacology & Therapeutics*, 146, 23-34. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.003>
- Moscoso, R. (2019). *Estudio del efecto anticonvulsivante de las macamidas sinteticas 3-metoxi-N-benciloleamida y 3-metoxi-N-bencillinoleamida en un modelo de epilepsia inducido en ratas Sprague-dawley*. (Bachiller), Universidad Católica de Santa María Arequipa - Perú.
- Moser, E, Moser, M y McNauhton, B. (2017). Spatial representation in the hippocampal formation: a history. *Nature Neuroscience*, 20 (11), 1448 – 1464. Doi: <https://doi.org/10.1038/nn.4653>
- National Institute of Neurological Disorders and Stroke. (2020). *Stroke: Hope through research*. United States: National Institutes of Health
- Okada, M., Nakanishi, H., Tamura, A., Urae, A., Mine, K., Yamamoto, K., y Fujiwara, M. (1995). Long-Term Spatial Cognitive Impairment after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats: No Involvement of the Hippocampus. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 15(6), 1012–1021. doi:10.1038/jcbfm.1995.127
- O'keefe, J (1975). Place unit in the hippocampus of the freely moving rat. *Experimental neurology*, 51, 78 – 109. doi: [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(76\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0014-4886(76)90055-8)



- O'keefe, J y Dostrovsky, J. (1971). The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Research*, 34(1), 171–175. doi:10.1016/0006-8993(71)90358-1
- O'keefe, J y Nadel, L. (1975). *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford university press.
- OMS. (2005). Manual de la OMS para la vigilancia paso a paso de accidentes cerebrovasculares de la OMS: estrategia paso a paso de la OMS para la vigilancia de accidentes cerebrovasculares. Retrieved from <https://www.paho.org/spanish/ad/dpc/nc/steps-stroke.pdf> website:
- Oré, R., Suárez, S., Rojas, L., Valdivieso, R., Oriondo, R., Tapia, F. y Trabuco, J. (2011). Efecto del extracto acuoso de maca sobre la función cognitiva en ratas recién destetadas. *Anales de la Facultad de Medicina*, 72, 13-16.
- Panta, A., Montgomery, K., Nicolas, M., Mani, K. K., Sampath, D. y Sohrabji, F. (2020). Mir363-3p Treatment Attenuates Long-Term Cognitive Deficits Precipitated by an Ischemic Stroke in Middle-Aged Female Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2020.586362>
- Pellegrini, D, Meli, E, y Moroni, F. (2004). Excitotoxicity in Cerebral Ischemia *Excitotoxicity in neurological disease* (1st ed.).
- Pertwee, R. (2015). *Endocannabinoids*. Suiza: Springer International Publishing.
- Pinel, J. (2001). *Biopsicología* (4ta ed.). Pearson Education.
- Pino-Figueroa, A., Nguyen, D. y Maher, T. J. (2010). Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca). *Ann N Y Acad Sci*, 1199, 77-85. Doi: 10.1111/j.17496632.2009.05174.x



- Pitts, M. W. (2018). Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. *Bio Protoc*, 8(5). doi: 10.21769/bioprotoc.2744
- Popp, A., Jaenisch, N., Witte, O. W. y Frahm, C. (2009). Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *Plos one*, 4(3), e4764. Doi: [10.1371/journal.pone.0004764](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004764)
- Portellano, J. y García, J. (2014). *Neuropsicología de la atención, funciones ejecutivas y la memoria*. Editorial Síntesis.
- Redolar, D. (2014). *Neurociencia Cognitiva* (Editorial Médica Panamericana Ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Reglódi, D., Tamás, A. y Lengvári, I. (2003). Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Research Bulletin*, 59(6), 459–466. doi:10.1016/s0361-9230(02)00962-0
- Rodriguez, W. (1999). El legado de Vygotski y de Piaget a la educación *Revista Latinoamericana de Psicología*. 31(3), 477-489.
- Rosenfeld, C y Ferguson, S (2014). Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *J Vis Exp* (84), e51194. doi: 10.3791/51194
- Ruan, J. y Yao, Y. (2020). Behavioral tests in rodent models of stroke. *Brain Hemorrhages*, 1(4), 171-184. doi: 10.1016/j.hest.2020.09.001
- Sánchez, H. y Reyes, C. (2015). *Metodología y diseños de la investigación científica*. Bussiness Support Aneth S.R.L.
- Schallert, T., Upchurch, M., Lobaugh, N., y Farrar, S. (1982). Tactile extinction: Distinguishing between sensorimotor and motor asymmetries in rats with unilateral nigrostriatal damage. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 16(3), 455–462. doi:10.1016/0091-3057(82)90452-x



Scherma, M., Masia, P., Satta, V., Fratta, W., Fadda, P. y Tanda, G. (2019). Brain activity of anandamide: a rewarding bliss? *Acta Pharmacol Sin*, 40(3), 309-323. doi:

10.1038/s41401-018-0075-x

Schhar, K, Brenneman, M. y Savitz, S. (2010). Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med*, 2 -13. Doi: <https://doi.org/10.1186/2040-7378-2-13>

Schiller, D., Eichenbaum, H., Buffalo, E., Davachi, L., Foster, D., Leutgeb, S. y Ranganath, Ch. (2015). Memory and Space: Towards an understanding of the cognitive map. *JNeurosci*, 35(41), 13904–13911. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2618-15.2015

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E. Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T.,

Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J., James, D.,

Hartensteins, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. y Cardona, A. (2012). Fiji: an open-

source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* (9) 676–682. Doi:

<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Schmidt, W., Schäfer, F., Striggow, V., Fröhlich, K. y Striggow, F. (2012). Cannabinoid receptor subtypes 1 and 2 mediate long-lasting neuroprotection and improve motor behavior deficits after transient focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 227, 313-326. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.080

Schomacher, M., Müller, H. D., Sommer, C., Schwab, S. y Schäbitz, W. (2008).

Endocannabinoids mediate neuroprotection after transient focal cerebral ischemia.

*Brain Research*, 1240, 213–220. Doi: 10.1016/j.brainres.2008.09.01

Seo, T., Kim, T., Shin, M., Ji, E., Cho, H., Lee, J. y Kim, C. (2014). Aerobic exercise

alleviates ischemia-induced memory impairment by enhancing cell proliferation and suppressing neuronal apoptosis in hippocampus. *Int Neurol J*, 18(4), 187-197.

Doi: [10.1016/j.brainres.2008.09.019](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.09.019)



- Sifuentes, G., León, S. y Paucar, L. (2015). Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp.): cultivo andino con propiedades terapéuticas. *Scientia Agropecuaria*, 6, 131-140.
- Solís, H. y López, E. (2009). Neuroanatomía funcional de la memoria. *Archivos de Neurociencia (México)*, 14, 176-187.
- Stocchetti, N., Taccone, F., Citerio, G., Pepe, P., D Le Roux, P., Oddo, M., Polderman, K., Stevens, R., Barsan, W., Maas, A., Meyfroidt, G., Bell, M., Silbergleit, R., Vespa, P., Faden, A., Helbok, R., Tisherman, S., Zanier, E., Valenzuela, T., Wendon, J., Menon, J. y Vincent, J. (2015). Neuroprotection in acute brain injury: an up-to-date review. *Critical Care*, 19:186. doi:10.1186/s13054-015-0887-8
- Taboada, K. y Tejada, A. (2013). *Estudio del efecto anticonvulsivante del extracto pentánico de lepidium peruvianum chacón sp. (maca) en ratas con epilepsia inducida por pilocarpina*. (Tesis de pregrado), Universidad Católica de Santa María, Arequipa.
- Taboada, K. (2016). *Avaliação do efeito neuroprotetor do extrato pentanólico de lepidium meyenii (maca amarela) em modelo animal experimental de isquemia cerebral focal*. (Mestre em Ciências da Saúde), Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein, Sao Paulo.
- Tolman, E. (1948). Cognitive maps in rats and men. *The Psychological review*, 55 (3), 190 – 207.
- Trattner, B., Berner, S., Grothe, B. y Kunz, L. (2013). Depolarization-induced suppression of a glycinergic synapse in the superior olivary complex by endocannabinoids. *J Neurochem*, 127(1), 78-90. doi: 10.1111/jnc.12369



- Vera, K. (2018). *Efecto neuroprotector de extracto pentánico de lepidium meyenii (maca) y macamidas sintéticas frente a la neurotoxicidad inducida por el péptido betaamiloide in vitro*. (Maestro), Universidad Católica de Santa María.
- Vicens, P., Redolat, R. y Carrasco, M. (2003). Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones. *Psicothema*, 15(4), 539-544.  
<https://www.psicothema.com/pdf/1104.pdf>
- Vu, H. (2012). Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibitors: Discovery in *Lepidium meyenii* (Maca) Extracts. 2012.
- Wahl, F., Allix, M., Plotkine, M. y Boulu, R. G. (1992). Neurological and behavioral outcomes of focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 23(2), 267–272. doi: 10.1161/01.str.23.2.267
- Wu, H., Kelley, C. J., Pino-Figueroa, A., Vu, H. D. y Maher, T. J. (2013). Macamides and their synthetic analogs: evaluation of in vitro FAAH inhibition. *Bioorg Med Chem*, 21 (17), 5188-5197. Doi: 10.1016/j.bmc.2013.06.034
- Yamashita, T. y Abe, K. (2016). Recent Progress in Therapeutic Strategies for Ischemic Stroke. *Cell Transplant*, 25(5), 893-898. Doi: 10.3727/096368916x690548
- Yeh, S., Tang, S., Tsai L., Jeng, J., Chen, C. y Hsieh, S. (2018). Neuroanatomy- and pathology-based functional examinations of experimental Stroke in Rats: Development and Validation of a New Behavioral Scoring System. *Front. Behav. Neurosci.* 12:316. Doi: 10.3389/fnbeh.2018.00316
- Yu, J., Moon, J., Jang, J., In Choi, J., Jung, J., Hwang, S. y Kim, M. (2018). Reliability of behavioral tests in the middle cerebral artery, occlusion model of rat. *Laboratory animals*, 0 (0), 1- 13. Doi: 10.1177/0023677218815210



Wali, M. (2020). Role of the somatosensory cortex in motor memory consolidation.

*Journal of Neurophysiology*, 124 (3), 648 – 651. Doi:10.1152/jn.00770.2019

Zarruk, J., García, I., Romera, V., Ballesteros, I., Moraga, A., Cuartero, M., Hurtado, O.,

Sobrado, M., Pradillo, J., Fernández, D., Serena, J., Castillo, M., Moro, M. y

Lizasoain, I. (2011). Tests neurológicos para la evaluación del pronóstico funcional

en modelos de ictus isquémico en roedores. *Rev Neurol*, 53(10), 607-618. doi:

<https://doi.org/10.33588/rn.5310.2011016>

Zhang, M., Martin, B. R., Adler, M. W., Razdan, R. K., Ganea, D. y Tuma, R. F. (2008).

Modulation of the balance between cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor

activation during cerebral ischemic/reperfusion injury. *Neuroscience*, 152(3), 753-

760. Doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.01.02

Zhu, M., Lei, Y., Zhang, K., Xia, Y. y Li, C. (2021). The pathophysiological mechanism of

ischemic stroke after hypobaric hypoxia simulation at high altitude. *Metabolic*

*Brain Disease*, 36(3), 483–490. Doi:10.1007/s11011-020-00653-9



ANEXOS

A. Matriz de consistencia

Tabla 14

Matriz de consistencia

“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL EFECTO NEUROPROTECTOR DE MACAMIDAS SINTÉTICAS EN LA REDUCCIÓN DE DAÑO CEREBRAL, CONSERVACIÓN DE LA RESPUESTA SENSORIO - MOTORA Y ALIVIO DEL DETERIORO DE MEMORIA Y APRENDIZAJE ESPACIAL CAUSADOS POR ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL EN RATAS. CUSCO - 2021.”				
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	HIPÓTESIS	OBJETIVOS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
¿Existe un efecto neuroprotector en la administración de macamidas sintéticas en ratas sometidas a modelo de isquemia cerebral focal en condiciones de altura, que reduzca el daño cerebral, conserve la función sensorio-motora y alivie el	Las macamidas sintéticas pueden ejercer efecto neuroprotector en la reducción del área de infarto, la conservación de la respuesta sensorio-motora y alivio del deterioro de memoria	<p><b>Objetivo Principal:</b> Evaluar el potencial efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en la reducción del área de infarto, conservación de la respuesta sensorio-motora y alivio del deterioro de memoria y aprendizaje espacial causados por isquemia cerebral focal en ratas.</p> <p><b>Objetivos específicos:</b></p> <p>1. Evaluar el efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en la reducción del área de infarto por isquemia cerebral focal, Cusco - 2021.</p>	<p><b>Variables Independientes (VI):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Administración macamidas sintéticas.</li> </ul> <p><b>Indicadores de VI:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Área de infarto.</li> <li>- Déficit sensorio - motor.</li> <li>- Déficit cognitivo.</li> </ul> <p><b>Variable Dependiente (VD):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Efecto neuroprotector.</li> </ul> <p><b>Indicadores de VD:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Superficie de tejido necrosado medido en mm<sup>3</sup>.</li> </ul>	<p><b>Tipo de Estudio:</b></p> <p>Cuantitativo, experimental-transversal, de tipo causa-efecto y prospectivo.</p> <p><b>Sujetos y muestra:</b></p> <p>Se utilizaron 35 ratas machos <i>Sprague dawley</i> de 2 - 3 meses de edad con pesos de 280 a 310 gramos, provenientes del bioterio de la Universidad Andina del Cusco durante el 2021.</p>



---

deterioro de memoria y aprendizaje espacial?	aprendizaje espacial causados por isquemia cerebral focal en ratas.	<ol style="list-style-type: none"><li>2. Evaluar el efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en la conservación de la respuesta sensorio-motora en un modelo isquemia cerebral focal, Cusco - 2021.</li><li>3. Evaluar el efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en el alivio de deterioro de memoria espacial causados por isquemia cerebral focal, Cusco - 2021.</li><li>4. Evaluar el efecto neuroprotector de macamidas sintéticas en el alivio de deterioro de aprendizaje espacial causados por isquemia cerebral focal en ratas, Cusco – 2021.</li></ol>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Puntaje de evaluación neurológica.</li><li>- Tiempo de latencia de encontrar el lugar de escape.</li><li>- Número de errores para encontrar el lugar de escape</li><li>- Tiempo acumulado en zona correcta.</li></ul> <p><b>Variables Controladas (VC):</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Ambiente de alojamiento y de evaluación (humedad, temperatura, iluminación, disposición de alimento y agua).</li><li>- Edad y peso de los animales.</li><li>- Protocolo de manipulación y evaluación de animales.</li><li>- Manejo del procedimiento experimental.</li></ul>	<p><b>Técnicas:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Técnica quirúrgica por oclusión de la arteria cerebral media (MCAO)</li><li>- Software Fiji.</li><li>- Evaluación neurológica de García modificada.</li><li>- Prueba del laberinto de Barnes.</li><li>- EthoVision XT 15.</li><li>- GraphPad Prism 5</li></ul>
--	---	---	--	--

---