



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**“EFECTO DE LA MACAMIDA
SINTÉTICA MACOMCH-01 SOBRE LOS
SÍNTOMAS PARKINSONIANOS DEL
MODELO DE HALOPERIDOL EN
RATAS”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN NEUROCIENCIA**

EMILIA GYR MORON

LIMA - PERÚ

2024

ASESOR

PhD. Luis Fernando Pacheco Otalora

JURADO DE TESIS

PRESIDENTE

Dr. Gustavo Gonzáles Rengifo

VOCAL

Dr. Alfonso Zavaleta Martínez-Vargas

SECRETARIO

Dr. Daniel Guillén Pinto

DEDICATORIA

A mi asesor, por la confianza.

A mi papá, por la cuidarme siempre.

Al Dr. Ortiz por las ideas.

A Taly, por los ánimos constantes.

A Julio, por el amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

No hubiese sido posible sin Carlos, Javi, Jhordy, Sergio, Anzu, Renato y Fran.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Tesis financiada por FONDECYT en
el Proyecto 60874-FONDECYT-BM

EFFECTO DE LA MACAMIDA SINTÉTICA MACOMCH-01 SOBRE LOS SÍNTOMAS PARKINSONIANOS DEL MODELO DE HALOPERIDOL EN RATAS

INFORME DE ORIGINALIDAD

19 % 	17 %	17 %	13 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Andrey F. L. Aguiar, Raquel M. P. Campos, Alinny R. Isaac, Yolanda Paes-Colli et al. "Long-Term Treatment with Cannabidiol-Enriched Cannabis Extract Induces Synaptic Changes in the Adolescent Rat Hippocampus", International Journal of Molecular Sciences, 2023 Publicación	<1 %
2	Submitted to Uniformed Services University of the Health Sciences Trabajo del estudiante	<1 %
3	eprints.medsab.ac.ir Fuente de Internet	<1 %
4	www.excli.de Fuente de Internet	<1 %
5	www.nature.com Fuente de Internet	<1 %

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	5
	1.1. Marco Teórico	5
	1.1.1. Parkinsonismo	5
	a. Definición y criterios diagnósticos	5
	b. Signos clínicos del parkinsonismo	7
	c. Etiología	8
	d. Tratamiento	9
	e. Modelos animales	9
	1.1.2. Vía nigro-estriatal	10
	1.1.3. Corteza motora, pre motora y prefrontal	12
	1.1.4. Neuronas dopaminérgicas	12
	a. Receptores dopaminérgicos (D1, D2, D3)	14
	1.1.5. Sistema endocannabinoide	15
	1.2. Hipótesis	18
	1.3. Objetivos	18
III.	METODOLOGÍA	19
	2.1. Diseño del estudio	19
	2.2. Operacionalización de variables	22
	2.3. Procedimientos	22
	2.3.1. Fármaco	22

2.3.2.	Mantenimiento y cuidado de animales	23
2.3.3.	Inyección con haloperidol	24
2.4.	Pruebas comportamentales	24
2.4.1.	Habitación	24
2.4.2.	Prueba de campo abierto	25
2.4.3.	Prueba de catalepsia	26
2.4.4.	Prueba de suspensión de alambre	27
2.5.	Análisis estadístico	28
2.6.	Consideraciones éticas	28
IV.	RESULTADOS	29
3.1.	Pruebas comportamentales	29
3.1.1.	Prueba de campo abierto	29
3.1.2.	Prueba de catalepsia	32
3.1.3.	Prueba de suspensión de alambre	39
V.	DISCUSIÓN	46
VI.	REFERENCIAS BIBLOGRAFICAS	53
VII.	ANEXOS	
	Anexo 1. Certificado de análisis de droga	
	Anexo 2. Aprobación del comité de ética	

RESUMEN

El parkinsonismo es un síndrome clínico caracterizado por la presencia de síntomas motores como la bradicinesia, temblor en reposo y rigidez. Este estudio buscó examinar los efectos de la administración de macamida sintética (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida a tres dosis diferentes en el comportamiento parkinsoniano de ratas, teniendo como hipótesis que la esta macamida sintética actúa como reductor de los síntomas motores e inhibidor FAAH. Se emplearon 30 ratas Sprague Dawley de dos meses y medio de edad y el parkinsonismo se generó mediante el antipsicótico haloperidol. El comportamiento motor fue evaluado mediante las prueba de campo abierto, catalepsia y la prueba de suspensión en alambre. Los resultados de las pruebas de campo abierto y catalepsia confirmaron el modelo de haloperidol. La prueba de catalepsia indicó un retraso en el efecto cataléptico del haloperidol a corto plazo (30 minutos) de la dosis de 1mg/kg y a mediano plazo (90 minutos) de las dosis de 0.1mg/kg y 10mg/kg. La prueba de suspensión en alambre indicó disminución de fuerza muscular en las ratas administradas con macamida. Se concluye que la macamida sintética (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida retrasa el efecto cataléptico y disminuye la fuerza muscular en ratas inducidas a síntomas parkinsonianos mediante el modelo agudo de haloperidol.

Palabras clave: macamidas, Inhibidor FAAH; Parkinsonismo

ABSTRACT

Parkinsonism is a clinical syndrome characterized by the presence of motor symptoms such as bradykinesia, resting tremor, and rigidity. This study sought to examine the effects of synthetic macamide (9Z, 12Z)-N-benzyloctadeca-9,12-dienamide administration at three different doses on parkinsonian behavior in rats, hypothesizing that synthetic macamide acts as a motor symptom reducer and FAAH inhibitor. Thirty two and a half months old Sprague Dawley rats were used and parkinsonism was generated by the antipsychotic haloperidol. Motor behavior was assessed by the open field test, catalepsy and the wire suspension test. The results of the open-field and catalepsy tests confirmed the haloperidol model. The catalepsy test indicated a delay in the cataleptic effect of haloperidol in the short term (30 minutes) of the 1mg/kg dose and in the medium term (90 minutes) of the 0.1mg/kg and 10mg/kg doses. The wire suspension test indicated decreased muscle strength in macamide administered rats. It is concluded that synthetic macamide (9Z, 12Z)-N-benzyloctadeca-9,12-dienamide delays the cataleptic effect and decreases muscle strength in rats induced to parkinsonian symptoms by an acute haloperidol model.

Keywords: *macamides, FAAH inhibitor; Parkinsonism.*

I. INTRODUCCIÓN

El parkinsonismo es un síndrome clínico que engloba los 4 principales síntomas motores de la enfermedad de Parkinson (EP): temblor en reposo, bradicinesia, rigidez e inestabilidad postural (1, 2). El parkinsonismo, a diferencia de la enfermedad de Parkinson (EP), no implica un diagnóstico que involucre la neuropatología asociada a este último, ya sea genética o neurodegenerativa (1). La EP se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en el *pars compacta* de la sustancia negra y su proyección hacia el cuerpo estriado debido a la toxicidad producto de la acumulación y deposición del mal plegamiento de la alfa sinucleína a nivel intracelular (3, 4).

Un estudio del 2021 en seis países latinoamericanos muestra que la prevalencia de parkinsonismo en adultos mayores de 65 años cuadriplica el de EP, siendo 8% para parkinsonismo y 2% en EP. El mismo estudio señala en Perú una prevalencia de 7.9% para parkinsonismo y 1.4% para EP (5).

Con el objetivo de entender el parkinsonismo se usan modelos *in vivo* e *in vitro*, siendo el modelo de haloperidol el más usado (6). El haloperidol es un antipsicótico típico de primera generación del grupo farmacológico de las Butirofenonas que actúa a nivel del SNC como antagonista de receptores dopaminérgicos D2 y D3 (7). Su funcionalidad es la reducción de síntomas positivos en la ansiedad aguda, psicosis, esquizofrenia y paranoia.

La función antipsicótica del haloperidol se asocia, en primer lugar, a la inhibición de receptores D2 en el área mesolímbica; asimismo, su inhibición de los mismos receptores en el área mesocortical se asocia a daños cognitivos y síntomas secundarios negativos y, finalmente, su actividad en la vía nigroestriatal se asocia

a los efectos extrapiramidales como catalepsia, temblores en reposo y rigidez (8, 9). El mecanismo patogénico del haloperidol aún está siendo estudiado pero existen hipótesis apuntando al incremento de especies reactivas de oxígeno (ERO), generación de ferroptosis y disminución de niveles de glutatión (10,11).

Dentro de estos síntomas motores, se entiende la catalepsia como un estado comportamental en el que funciona el mantenimiento de equilibrio pero se inactivan los sistemas asociados a la locomoción (12). En la misma línea, se ha demostrado que la rigidez muscular generada por haloperidol presentada en roedores es similar a la presentada por pacientes de EP mediante electromiografía (EMG) (13).

En la actualidad, el tratamiento de EP se enfoca en combatir los síntomas mediante drogas que estimulan los receptores dopaminérgicos; sin embargo, ninguna de ellas ha probado ser neuroprotectoras o modificadora de la enfermedad (14). Nuevas investigaciones concluyen que la activación del sistema cannabinoide se ha mostrado como un neuroprotector con alta potencia por la presencia de efectos antioxidantes, de bloqueo de canales de calcio y antiinflamatorios para EP (15, 16).

El sistema cannabinoide está con formado por receptores de proteína G, estos se clasifican, principalmente, en receptores CB1 y CB2 (16). En lo que respecta a la enfermedad de Parkinson, se ha encontrado que ocurren cambios en el sistema cannabinoide como mayor activación de receptores CB1 en neuronas del estriado, aumento de receptores CB2 en la zona de lesión nigroestriatal y pérdida de receptores CB2 debido a la degeneración de neuronas dopaminérgicas (17, 18).

Los compuestos que actúan sobre el sistema cannabinoide tienen influencia en varios elementos como en los receptores CB1 y CB2 o en hidrolasa de amidas de ácidos grasos (15). Por otro lado, la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH),

es una enzima que hidroliza las amidas; por lo que su inhibición es un agente protector por incrementar anandamida, cannabinoides endógeno, para la activación de receptores cannabinoides y podría evitar los efectos no deseados de los receptores CB1 como deterioro en la cognición y control motor (19,20). En lo sucesivo, se han realizado pruebas *in-vivo* con otros compuestos inhibidores de FAAH, reafirmando el aumento de anandamida en el cerebro (21,22).

El Perú es uno de los países con mayor biodiversidad poseyendo 84 de las 104 zonas de vida existentes en el planeta (23). Un compuesto altamente estudiado que inhibe FAAH son las macamidas, constituyente de la maca o *Lepidium meyenii* (24, 25). En específico, se han reportado efectos neuro protectores de las macamidas en un estudio de neuronas tratadas con 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) en pez cebra con la inhibición de AChE y en células de glioblastoma mediante la unión con receptores CB1 (26, 27). Los efectos biológicos de las macamidas varían de acuerdo a su estructura química, estructural y topológica, es por eso que se han identificado 26 macamidas comprobando que la (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida) ($C_{25}H_{39}NO$) en comparación a otras macamidas y macaenos derivados de la *Lepidium meyenii* (maca) la sitúa como el mayor inhibidor de citotoxicidad (28, 29).

Se han realizado estudios con el efecto antioxidante de la maca, sin embargo, no se ha profundizado en el efecto específico de la macamida (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida), cuya composición ha comprobado tener un efecto inhibitor significativo en FAAH. El presente estudio buscó evaluar el efecto neuroprotector de la macamida sintética mediante un modelo animal de parkinsonismo generado por haloperidol. Por lo tanto, la (9Z, 12Z)-N-

benciloctadeca-9,12-dienamida) podría actuar como un novedoso tratamiento neuroprotector para el parkinsonismo actuando en diferentes agentes asociados al sistema cannabinoide.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Marco Teórico

1.1.1. Parkinsonismo

a. Definición y criterios diagnósticos

La enfermedad de Parkinson se caracteriza por la presencia de un cuadro clínico que implica alteraciones motoras significativas asociados a degeneración de la vía nigroestriatal con un pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas y presencia de cuerpos de Lewy (Apartado 2.1.5.2) (2).

Los criterios de diagnóstico de la EP han sido desarrollados por la sociedad internacional de Parkinson y trastornos del movimiento y tienen una precisión de 92%, siendo limitados por la dificultad de identificación de algunos parkinsonismos (tabla 1) (30). La misma tiene como pre requisito manifestar parkinsonismo, lo que implica tres síntomas cardinales: rigidez, temblor en reposo y bradicinesia. Rigidez implica resistencia al movimiento pasivo de extremidades, el temblor en reposo implica presencia de 4 a 6 Hz en una extremidad relajada y , finalmente, bradicinesia es el enlentecimiento motor en amplitud y velocidad (30). Por otro lado, también se presentan síntomas no motores como tristeza, psicosis, ansiedad y trastornos del sueño que afectan significativamente en la calidad de vida y autonomía del paciente (31). El síntoma no motor más estudiado es la demencia, reflejándose en la disminución del sistema ejecutivo, atencional, viso espacial y de la memoria (32).

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico clínico de la EP según la MDS

Manifestaciones de parkinsonismo	Rigidez Temblor en reposo Bradicinesia Inestabilidad postural
Criterios de soporte	<ol style="list-style-type: none">1. Mejoría de síntomas con terapia dopaminérgicas.2. Presencia de discinesias inducidas por levodopa.3. Temblor en reposo de una extremidad4. Resultado positivo de al menos un test: Pérdida olfatoria, SPECT con 123I-MIBG o ecografía transcraneal del parénquima cerebral.
Criterios de exclusión	<ol style="list-style-type: none">1. Ataxia espinoocerebelosa2. Atrofia multisistémica3. Parálisis supranuclear progresiva4. Demencia frontotemporal5. Parkinsonismo por medicamentos6. Hidrocefalia de presión normal7. Síndrome corticobasal8. Temblor esencial

b. Signos clínicos de la EP

Tabla 2. Signos clínicos de la EP

Temblor	Es involuntario pero desaparece ante el movimiento voluntario y el sueño. Frecuencia de 4 a 8 ciclos por segundo.
Hipertonía muscular	Resistencia al movimiento. Los músculos se mantienen tensos y contraídos generando una alteración en la inhibición recíproca. Responsable de la postura parkinsoniana: flexión de cadera y rodillas y extremidades superiores en aducción.
Acinesia	Ausencia de movimiento, se asocia a rostros no expresivos. <ol style="list-style-type: none">1. Bradicinesia: Lentitud en el inicio y ejecución del movimiento.2. Hipocinesia: Dificultad para mantener un ritmo esperado durante el movimiento.
Alteraciones posturales (34)	Adelantamiento de centro de gravedad, astasia y amiotrofia por mantenimiento de la postura.
Alteraciones de la marcha	Dificultad en la amplitud de movimiento, pasos cortos y con poca elevación del suelo.
Otras alteraciones significativas (35)	<ol style="list-style-type: none">1. Dolor: 70% de pacientes. Se da en articulaciones, musculares y neurológicos.

2. Disfunciones vegetativas: problemas urinarios, sialorrea, hipotensión ortostática y trastorno del sueño.
 3. Alteraciones del habla: reducción de movimientos vocales.
 4. Depresión
 5. Demencia: 15 y 25%
-

c. Etiología

Una de las hipótesis de la etiología de la EP es la disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (36). El déficit del complejo mitocondrial I aumenta la producción de la especie reactiva de oxígeno (ERO), que contiene radicales libres en la sustancia negra generando un desequilibrio (37). El desequilibrio entre la producción de radicales libres y la habilidad del cuerpo de producir antioxidantes para evitar la toxicidad tiene como efecto el estrés oxidativo afectando la célula y generando muerte celular (38, 39).

La etiología de la enfermedad en un 10% incluye patrones de herencia genética Mendeliana, ocho de los genes Mendelianos identificados son *parkin*, *PTEN-induced kinase 1 (PINK1)*, *DJ-1*, *ATP13A2*, *SNCA* y *Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)* (40). Por lo tanto, en un 90% implica múltiples factores genéticos y ambientales (41).

d. Tratamiento

El tratamiento para la EP comprende tres categorías (a) precursores de la dopamina, (b) medicamentos anticolinérgicos y (c) medicamentos para síntomas no motores como depresión o alteraciones de sueño (42). En primer lugar, el principal precursor de dopamina, y también el tratamiento fundamental de la EP es la Levodopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) (43). Este medicamento se consume mayormente de forma oral y, una vez metabolizado en el plasma, traspasa la barrera hematoencefálica. Se ha demostrado que el uso a largo plazo de la Levodopa aumenta el estrés oxidativo y síntesis de homocisteína, incrementando la neurodegeneración.

En segundo lugar, los medicamentos colinérgicos disminuyen la actividad de acetilcolina y reducen los síntomas motores, sin embargo, solo genera efecto en un 50% de pacientes (33,44). Finalmente, los medicamentos para síntomas no motores varían de acuerdo a la presencia de los mismos pero suelen involucrar benzodiacepinas, antipsicóticos atípicos y fluoxetina.

e. Modelos animales

Tabla 3. Modelos animales de la EP y parkinsonismo

MPTP (52,45)	MPTP es liposoluble, por lo que accede al cerebro y es convertido en MPP+ por los astrocitos y neuronas serotoninérgicas con MAO-B. El MPP+ afecta la respiración mitocondrial.
6OHDA (46)	La 6OHDA utiliza la metodología de inyección estereotáxica cerebral. Es ampliamente usada por

su especificidad al dañar neuronas dopaminérgicas de la vía nigro-estriatal.

- Haloperidol (13) El antipsicótico haloperidol es un agonista inverso de la dopamina, bloqueando principalmente los receptores D2 en el cerebro. Genera parkinsonismo mediante la catalepsia.
- Rotenone (47) Inhibidor mitocondrial de NADH deshidrogenasa generando disminución de dopamina en el estriado posterior y corteza pre frontal. Modelo generado por inyecciones intraperitoneales de entre 1.5mg/kg y 2.5mg/kg de manera crónica.
-

1.1.2. Vía nigro-estriatal

La EP se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en el *pars compacta* de la sustancia negra y su proyección hacia el cuerpo estriado (48). Los agregados de alfa sinucleína forman cuerpos de Lewy y su incremento empieza en el tronco encefálico y bulbo olfatorio, pasan por el mesencéfalo y, finalmente, se expanden por la corteza (49). Braak (2003) identificó seis etapas neuropatológicas de la enfermedad (50). Las etapas 1 y 2 refieren a la etapa pre-sintomática en la que la inclusión de cuerpos de Lewy se manifiesta en la médula oblongada y bulbo olfatorio. En las etapas 3 y 4 se afectan la sustancia negra, núcleos del mesencéfalo y cerebro anterior. Finalmente, en la etapa 5 y 6 se afecta la neocorteza y los síntomas clínicos se amplían significativamente (50). Los

síntomas debutan en un lado del cuerpo cuando las concentraciones de dopamina decaen debajo de 60 a 70% en el cuerpo estriado contralateral (51).

Los síntomas moteres clásicos de la EP son causados por pérdida de neuronas dopaminérgicas en la vía nigro-estriatal, reduciendo el tamaño de las proyecciones axonales (52). La vía nigro-estriatal se extiende desde la sustancia negra pars compacta (SNc) hasta el estriado ventral mediante el prosencéfalo (figura 1). Esta se conforma principalmente de neuronas dopaminérgicas con mayor presencia de soma y dendritas en el SNc y de axones en el estriado y con una regulación predominante de transmisión mediante difusión (53).

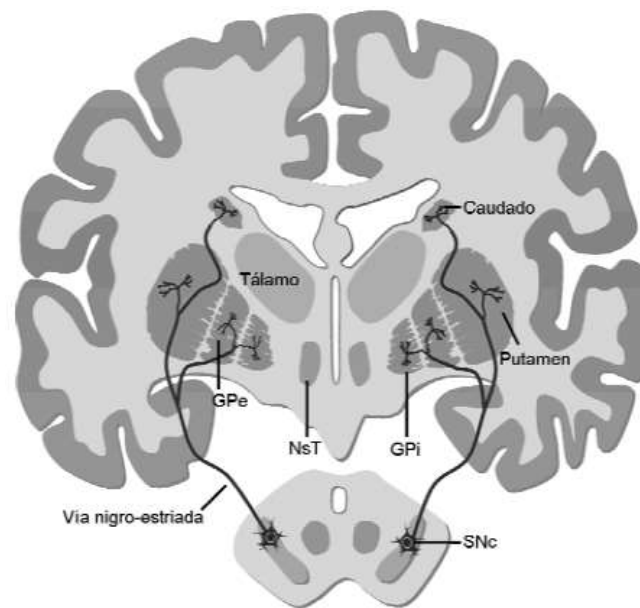


Figura 1. Vía nigro-estriatal parte desde la SNc y se proyecta hacia el estriado caudado y putámen. Gpe: segmento externo del globo pálido. Gpi: segmento interno del globo pálido. NST: Núcleo subtalámico (54).

1.1.3. Corteza motora, pre motora y prefrontal

El daño generado en el estriado afecta el sistema estriado-pálido-tálamo-cortical hacia la corteza motora y el sistema tálamo-cortical hacia la corteza premotora y prefrontal (55). El circuito motor controla los movimientos y su vía regulatoria incluye el área sensoriomotora agranular, el putamen, la porción caudal de los ganglios basales y una vía diencefálica. Asimismo, estos transmiten información a campos frontales oculares y áreas de asociación relacionadas a operaciones cognitivas.

1.1.4. Neuronas dopaminérgicas

Las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo son la mayor fuente de dopamina (DA) en el sistema nervioso central. Las neuronas dopaminérgicas son un grupo heterogéneo anatómicamente y funcionalmente localizadas en el diencefalo, mesencéfalo y bulbo olfatorio, siendo la fuente en un 90% de dopamina (DA) en el sistema nervioso central (56). El sistema dopaminérgico del mesencéfalo está dividido en varias vías como la vía nigroestriatal, la vía mesolímbica y la vía mesocortical. La primera inicia en la SNc hasta el estriado dorsal y juega un rol fundamental en el movimiento. Las dos últimas vías inician en el área tegmental ventral (VTA) proyectando, la mesolímbica, al núcleo acumbens, bulbo olfatorio, septum, amígdala e hipocampo y; la mesocortical, al área prefrontal, giro cingulado y corteza peririnal. Ambas vías se asocian a comportamiento basado en la emoción como motivación y recompensa.

En la misma línea, las neuronas dopaminérgicas son particularmente sensibles al estrés oxidativo por su alto nivel de metabolismo de oxígeno, bajo nivel de antioxidantes y alto nivel de hierro; pudiendo así recibir ERO desde vías enzimáticas y catabolismo no enzimático involucrando MAO (57).

Con respecto a la síntesis de la misma, la tirosina es transportada desde la sangre al cerebro por transportadores de aminoácidos. Una vez que ingresa a la neurona, se transforma en dihidroxifenilalanina (L-dopa) mediante la enzima tirosina hidroxilasa (TH). La enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) es, posteriormente, la encargada de transformar la L-dopa en dopamina (58). Dentro de la neurona dopaminérgica, el neurotransmisor será transportado mediante vesículas sinápticas y ante un potencial de acción serán liberadas en el espacio extracelular mediante la fusión de la vesícula con la membrana celular.

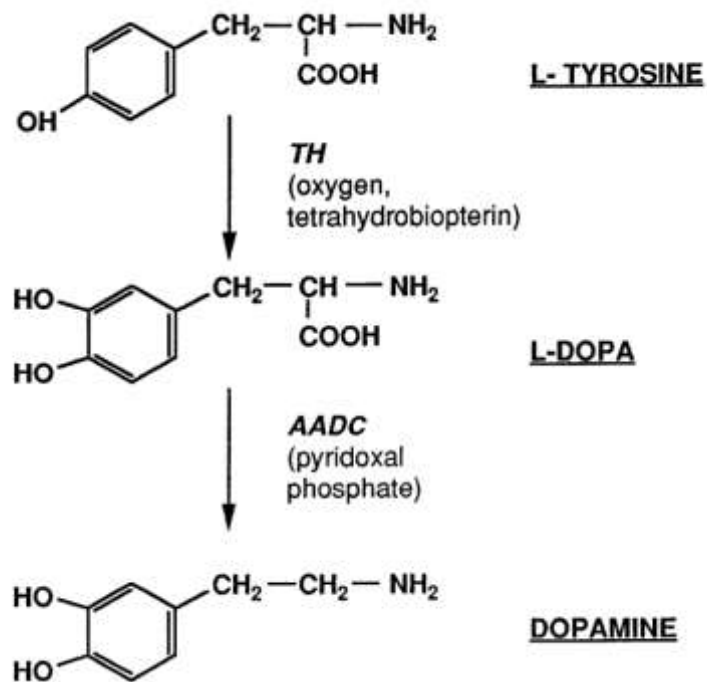


Figura 2. Biosíntesis de la dopamina. Las enzimas responsables son la tirosina hidroxilasa (TH) y la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) (59).

a. **Receptores dopaminérgicos (D1, D2 y D3)**

La dopamina, una vez liberada, interactúa con receptores dopaminérgicos. Estos son receptores transmembrana acoplados a proteína G y se dividen en 5 (D1, D2, D3, D4 y D5) (59). Estos, a su vez, se agrupan en tipo 1 y tipo 2. En primer lugar, los receptores dopaminérgicos de tipo 1 involucran D1 y D5 y es el que se presenta en mayores niveles. Dentro de sus características estructurales, son 80% homólogos en sus dominios transmembrana y el terminal COOH es 7 veces más largo que los de D2 (60). La activación de receptores D1 no tiene efecto significativo en la locomoción; sin embargo, D1 es esencial para que D2 produzca la máxima estimulación locomotora (59,61).

En segundo lugar, los receptores de tipo 2 incluyen receptores D2, D3 y D4. Dentro de sus características estructurales, son entre 50 y 75% homólogos en sus dominios transmembrana. Con respecto a la motricidad, la activación de autoreceptores D2 reduce la DA y la actividad locomotora; mientras que la activación de receptores D2 postsinápticos incrementa ligeramente la locomoción (59, 61). Asimismo, debido a que los autoreceptores D2 son activados con bajas dosis de agonistas dopaminérgicos en comparación a los receptores postsinápticos, los agonistas dopaminérgicos pueden generar disminución del movimiento a bajas dosis y aumento de movimiento a dosis altas (60). En la misma línea, los receptores D2 se asocian a reacciones psicóticas, por lo que la mayoría de antipsicóticos son

bloqueadores de receptores D2. El receptor D3 impresiona jugar un rol inhibitor en la locomoción y un rol fundamental en el mecanismo de recompensa.

Finalmente, un factor adicional que juega un rol en el efecto combinado de la activación de D1 y D2 es la presencia de receptores D1 en la SNr en los terminales GABA, que son responsables de la liberación de dopamina (62).

1.1.5. Sistema cannabinoide

El sistema cannabinoide es un sistema de comunicación celular presente en el sistema inmunológico y en el sistema nervioso. Regulan numerosos procesos celulares asociados al envejecimiento, hambre, dolor, ansiedad, relajación muscular, entre otros (63). El sistema cannabinoide está conformado por receptores cannabinoideos y endocannabinoideos. Por un lado, los receptores cannabinoideos se clasifican, principalmente, en receptores CB1 y CB2 (16). Y, por otro lado, dentro de los endocannabinoideos los más estudiados son el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) y la anandamida (AEA).

En primer lugar, los receptores CB1 y CB2 pertenecen a la familia de receptores de siete segmentos transmembrana acoplados a la proteína G (GPCR) (64). El receptor CB1 se expresa con mayor prevalencia en el cerebro, específicamente en corteza, hipocampo, núcleo estriado y cerebelo. Se ha encontrado que se ubica mayormente en exones y terminales sinápticos (41,65). En principio, los receptores CB1 se encuentran mayormente en áreas del cerebro asociadas al control motor, cognitivo y emocional; como también, en menor cantidad, en áreas asociadas al dolor, sueño y regulación hormonal (66).

Por otro lado, el receptor CB2 se encuentra en cantidades mínimas en el cerebro y en mayor cantidad en el sistema inmune, en tejidos pulmonares, huesos, sistema gastrointestinal y bazo (67). Existen estudios actuales que comprueban su presencia en el soma y dendritas de las neuronas pero aún en cantidades bajas (68). Asimismo, cuenta con la misma estructura que el receptor pero su distribución podría dar señales de su efecto fisiológico distinto (69). Se ha encontrado mayor presencia de los mismos en el cerebro ante trastornos neurodegenerativos (67).

Los endocannabinoides tienen una comunicación retrógrada, es decir, se sintetizan en los terminales post sinápticos, son liberados al espacio sináptico y se unen a receptores en terminales presinápticos. Estos son lípidos derivados del ácido araquidónico (AA) y su función es principalmente inhibir la liberación de neurotransmisores mediante su actuación como mensajeros retrógrados, modulando los neurotransmisores por acción sobre los receptores cannabinoides presinápticos (65).

El 2-AG tiene mayor disposición en el cerebro y es un agonista de receptores CB1 y la AEA es agonista parcial de CB1 y CB2. La ruta metabólica en la síntesis de 2-AG implica acción de una fosfolipasa C (PLC) y una diaciglicerol lipasa (DAGL). La PLC actúa sobre el ácido araquidónico generando glicerol (DAG) y éste es convertido en 2-AG mediante el DAGL (70). Se han estudiado funciones específicas como la disminución de excitabilidad asociada a convulsiones epileptiformes y de muerte de neuronas hipocampales por parte de la 2-AG (65,71). Este efecto neuroprotector se da mediante la inhibición de glutamato y de especies reactivas de oxígeno.

En el caso de la AEA, esta es generada por hidrólisis de N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NAPE) mediante la acción de N-araquidonoil-fosfatidiletanolamina fosfolipasa D (NAPE-PLD). Es importante mencionar que las concentraciones de NAPE suelen ser bajas, pero aumentan ante el incremento de CA^{2+} intracelular (72).

Una vez sintetizados, los endocannabinoides pueden ser liberados al espacio extracelular o interactuar con receptores endocannabinoides presinápticos (73). La señalización de los endocannabinoides culmina en la degradación de la molécula señal. Una de las enzimas involucradas en la degradación es la amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH). La FAAH tiene una ubicación postsináptica, por lo que la AEA debe ser transportada hacia la misma.

1.2. Hipótesis

La administración intraperitoneal de MACOMCH-01 reduce los síntomas motores en ratas inducidas a parkinsonismo mediante haloperidol.

1.3. Objetivos

General

Evaluar el efecto de la administración intraperitoneal de MACOMCH-01 en el comportamiento de ratas inducidas a síntomas parkinsonianos mediante haloperidol.

Específicos

1. Evaluar la actividad locomotriz general de los animales experimentales mediante la prueba comportamental de campo abierto 180 minutos posteriores a la administración de MACOMCH-01.

2. Evaluar la catalepsia de los animales experimentales mediante la prueba de catalepsia a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos posteriores a la administración de MACOMCH-01.

3. Evaluar el déficit motor de los animales experimentales mediante la prueba de suspensión de alambre a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos posteriores a la administración de MACOMCH-01.

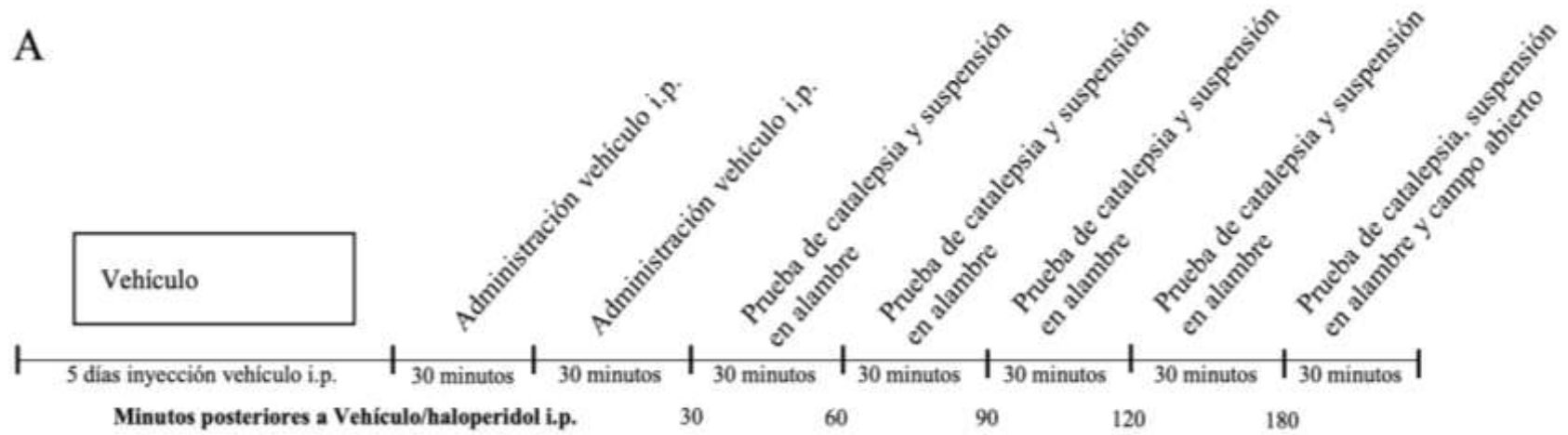
III. METODOLOGÍA

2.1. Diseño del estudio

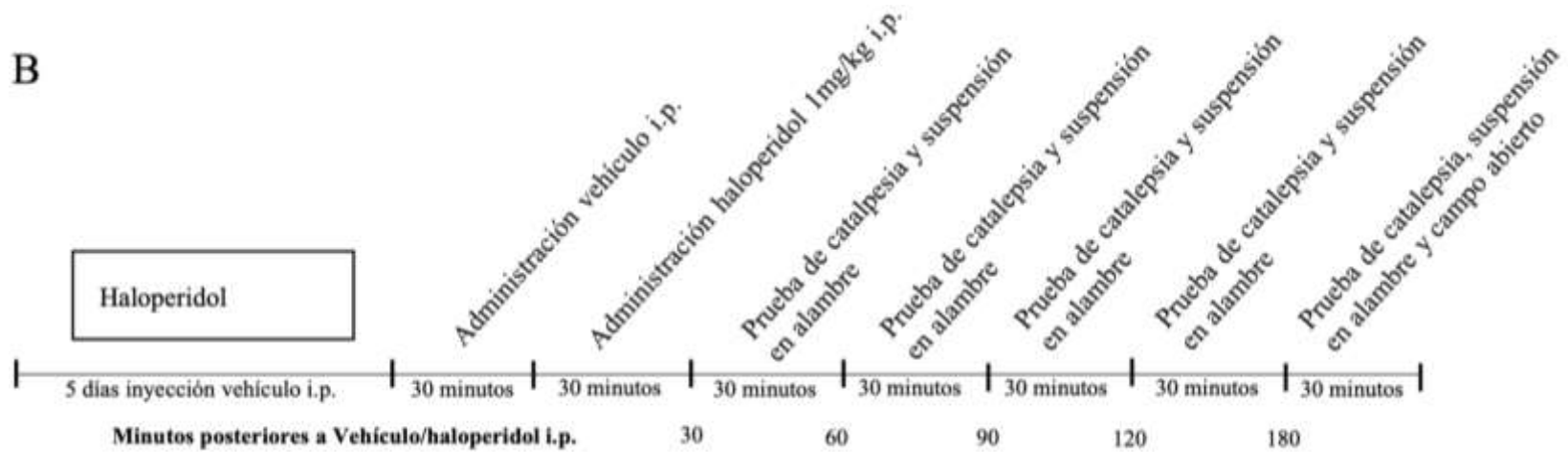
La investigación es experimental pre-clínica y se plantea como un estudio experimental aleatorizado. Para lograr el objetivo del estudio se realizaron tres pruebas comportamentales: Prueba de campo abierto, prueba de catalepsia y prueba de suspensión en alambre. Se dividió la muestra en 5 grupos, dos de los cuales fueron controles (positivo y negativo) y tres experimentales con distintas dosis del fármaco.

- Grupo I: ratas inyectadas intraperitonealmente con 1mg/kg de disolvente como vehículo.
- Grupo II: ratas inyectadas intraperitonealmente con 1mg/kg de haloperidol para generar síntomas parkinsonianos.
- Grupo III: ratas inyectadas intraperitonealmente con 1mg/kg de haloperidol para generar síntomas parkinsonianos y con administración intraperitoneal de la macamida sintética (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida en una concentración de 10mg/kg diarios por 5 días (Figura 3)
- Grupo IV: ratas inyectadas intraperitonealmente con 1mg/kg de haloperidol para generar síntomas parkinsonianos y con administración intraperitoneal de la macamida sintética (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida en una concentración de 1mg/kg diarios por 5 días (Figura 3).
- Grupo V: ratas inyectadas intraperitonealmente con 1mg/kg de haloperidol para generar síntomas parkinsonianos y con administración intraperitoneal de la macamida sintética (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida en una concentración de 0.1mg/kg diarios por 5 días (Figura 3)

A



B



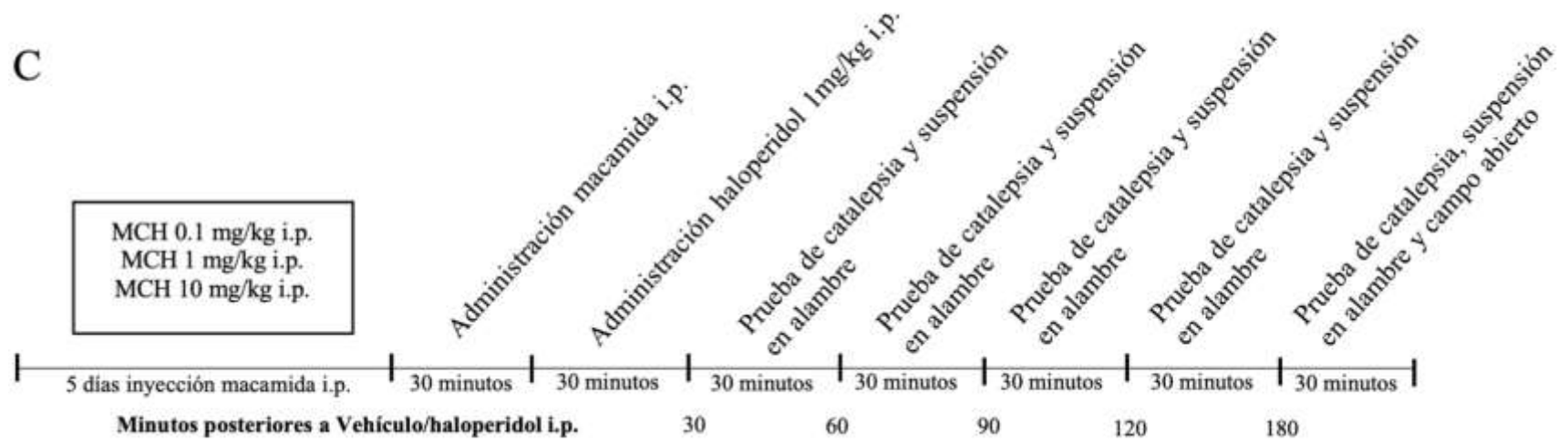


Figura 3. Guia de ruta A) Grupo vehículo (B) Grupo haloperidol y (C) Grupos experimentales

2.2. Operacionalización de variables

Tabla 4. Operacionalización de variables

Variables	Instrumento	Tipo	Dimensiones	Indicador
			Distancia recorrida	centímetros
				centímetros/
Actividad	Prueba	cuantitativo	Velocidad	segundos
locomotriz	campo	continua	Frecuencia de	
general	cubierto		inmovilidad	segundos
		cuantitativo		conteo de
		discreto	Cruces entre cuadrantes	cruces
Tono muscular	Prueba de	cuantitativo	Tiempo de	
	cataplexia	continuo	mantenimiento de ambas	segundos
			extremidades en la barra	
Fuerza	Prueba de	cuantitativo	Tiempo de suspensión en	
muscular	suspensión	continuo	el alambre	segundos
	de alambre			

2.3. Procedimientos

2.3.1. Fármaco

Se hizo uso de la macamida sintética (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida (MACOMCH-01), sintetizada por MEDALCHEMY, S.L., San Vicente de Raspeig, Alicante, España (Anexo 1). Esta macamida demostró tener mayor efecto inhibitor de FAAH en comparación a otras 7 macamidas presentes en la maca (19).

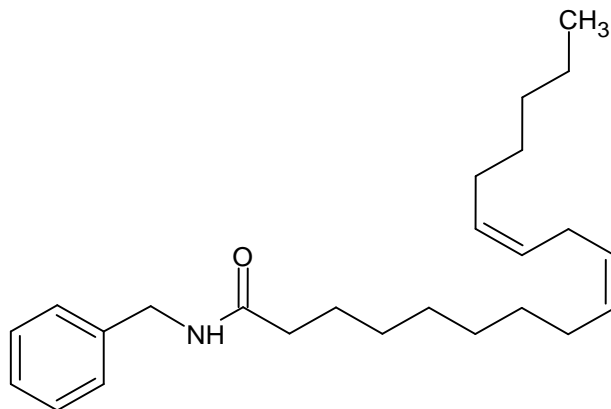


Figura 4. Estructura química de MACOMCH-01 (C₂₅H₃₉NO)

La administración se dio durante 5 días previos a las pruebas comportamentales y a la inyección con haloperidol. El día de la evaluación comportamental se inyectó la macamida 30 minutos antes de la inyección de haloperidol y 60 minutos previos al inicio de las pruebas comportamentales.

2.3.2. Mantenimiento y cuidado de animales

Se trabajó con 30 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de 2 meses de edad y con peso de 200g- 250g. La elección del sexo fue para evitar la variabilidad de las hormonas ováricas y el seguimiento del ciclo estral. Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico PET con dimensiones de 37.3 centímetros de largo, 23.4 de ancho y 14 de alto en grupos de 4 ratas. Los animales son procedentes del Bioterio automatizado de la Universidad Andina del Cusco. Las jaulas se mantuvieron en un ambiente automatizado de ciclo luz / oscuridad de 12 horas con inicio de periodo de luz a las 6h00, temperatura entre 23 a 25 °C y humedad relativa entre 40 y 45%. Se administró alimento balanceado en forma de pellet y agua ad libitum y la limpieza se realizó interdiariamente renovando la viruta de la jaula. Asimismo, se siguieron los lineamientos de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (74). Todos los instrumentos usados en contacto con los

animales fueron esterilizados mediante luz UV. La administración de la macamida sintética (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida se realizó mediante inyección intraperitoneal a la rata entre las 10 y 11am, cuando el consumo de comida es mínimo (75).

2.3.3. Inyección con haloperidol

El animal fue inyectado con haloperidol el día 5 de la administración de macamida, día en el que se también realizaron las evaluaciones comportamentales. El fármaco usado fue haloperidol solución inyectable 5mg/1ml del laboratorio Caplin Point Laboratories LTD. La administración intraperitoneal se realizó posterior a la habituación por dos horas en el área de evaluación comportamental y posteriormente fueron devueltas a sus jaulas. La administración del haloperidol se dio en cantidades correspondientes al peso con una dosis de 1ml/kg.

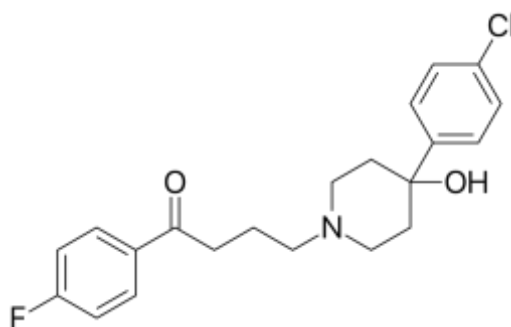


Figura 5. Estructura química del haloperidol.

2.4. Pruebas comportamentales

2.4.1. Habituación

Las ratas fueron habituadas al ambiente, manipulación y administración intraperitoneal. Para la habituación del ambiente de pruebas comportamentales las ratas fueron llevadas al área 3 días previos al día 5 (pruebas comportamentales) a las 11:30h por dos horas. En la sala de evaluación comportamental se mantuvieron

las condiciones con respecto a alimentación y temperatura. En el caso de la habituación a la manipulación y administración intraperitoneal, se realizó una inyección intraperitoneal de vehículo dos días previos al inicio de la administración de la macamida en el día 1.

2.4.2. Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto tiene como objetivo medir los niveles de actividad locomotriz general en roedores. Las variables de medición más usadas son: velocidad, distancia recorrida, tiempo de inmovilidad y cruce entre cuadrantes. La prueba se realiza en un cuadrado de acrílico negro de 50x50cm y una pared alrededor del mismo de 50cm. Asimismo, la base del cuadrado es dividido en 4 sub-cuadrados (2x2) para medir el cruce. Para la presente investigación se realizó la prueba 180 minutos posteriores a la inyección con haloperidol siguiendo la metodología de Shi, et al. (2006) con modificaciones (51). La rata se colocó al centro del cuadrado y su comportamiento fue grabado por 5 minutos con una cámara web Logitech BRIO con video 4K Ultra UH con el software EthoVision XT 15. Asimismo, se limpió el resto de olor y defecación entre cada ensayo con alcohol de 70% y permitiendo la evaporación por 5 minutos. Para el análisis de los datos de video se usó también el software EthoVision XT 15.

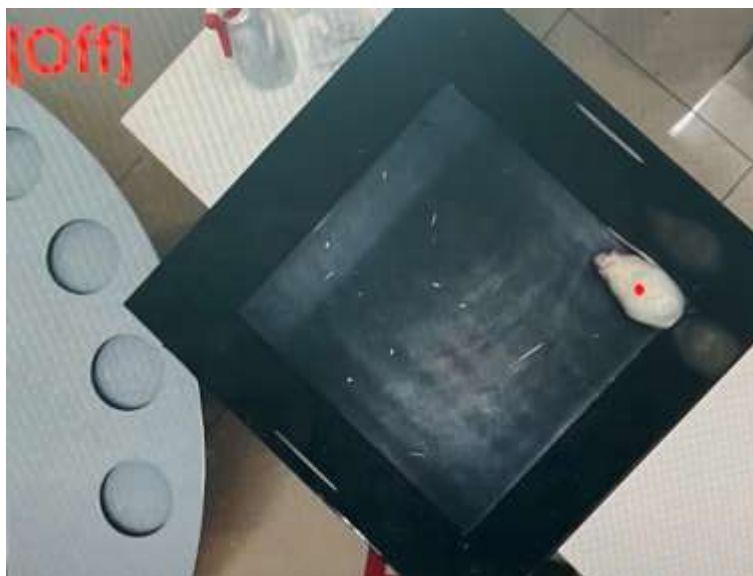


Figura 6. Grabación del software Ethovision XT versión 15 para el análisis comportamental en la prueba de campo abierto.

2.4.3. Prueba de catalepsia

La prueba de catalepsia consiste en posicionar a los animales en una barra de 1cm de diámetro y 12 centímetros de altura y se mide el tiempo de mantenimiento de la posición inicial en un intervalo de 1 minuto (6,77). Se confirma la presencia de catalepsia luego de 20 segundos de mantenimiento en la misma posición de apoyo en la barra (77). En el presente estudio se realizó la prueba para confirmar el modelo de parkinsonismo y evaluar el tono muscular. La prueba se repitió a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos posteriores a la inyección de haloperidol.



Figura 7. Grabación de la rata durante la prueba para confirmar el tiempo de mantenimiento en la barra.

2.4.4. Prueba de suspensión de alambre

La prueba de suspensión de alambre se usa para medir la fuerza muscular y coordinación del roedor. La prueba consiste en colocar al roedor suspendido en el aire con sus dos extremidades superiores agarradas de un alambre de 50cm de largo y a 80cm de la base del suelo (3). Se contabiliza el tiempo de mantenimiento en el alambre hasta la caída por un tiempo máximo de 60 segundos. En el presente estudio se realizaron tres evaluaciones por rata y se promediaron los resultados. La prueba se repitió a los 30, 60, 90, 120 y 180 minutos posteriores a la inyección de haloperidol.



Figura 8. Prueba de suspensión de alambre

2.5. Análisis estadístico

Para definir la linealidad de los datos obtenidos se usó el test de Shapiro-Wilk para normalidad. Asimismo, los valores de p menores a 0.05 se determinaron como estadísticamente significantes.

Al ser todas las variables numéricas y con un n mínimo, se compararon las medias de los valores de las variables entre los grupos mediante análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para muestras repetidas. Para los análisis post hoc, en los que identifica al grupo diferente, se usó el test de Dunn. Toda la data numérica fue procesada con el programa STATA 15.

Posterior al análisis estadístico de ANOVA, se decidió evaluar los datos a nivel individual. Para ello, en primer lugar se realizó la prueba de Grubbs para detectar valores atípicos encontrando dos datos atípicos y se calculó la variación relativa con la fórmula: $Vr = (t2/t1)*100$ para la realización de los gráficos lineales considerando el tiempo directamente anterior.

2.6. Consideraciones éticas

La presente investigación fue aprobada con fecha 22 de junio del 2023 por el Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (**Anexo 2**) cumpliendo las tres Rs de ética de investigación con animales de experimentación.

IV. RESULTADOS

3.1. Pruebas comportamentales

3.1.1. Prueba de campo abierto

El efecto locomotor del haloperidol fue medido mediante la prueba de campo abierto a los 180 minutos. Se realizó la prueba paramétrica de ANOVA y se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.001$). Esta prueba sirvió para confirmar el modelo a los 180 minutos, pues se encontraron diferencias significativas entre el grupo vehículo y los grupos administrados con haloperidol incluyendo los experimentales.

Tabla 9. Resultados prueba de campo abierto

Parámetro	Grupo experimental	Basal			180 min		
		media	de	%	media	de	%
Velocidad	Sham+Veh	5.6	2.11	-	3.6	2.22	-
	Hal+Veh	7.3	2.19	100.0	0.4	0.17	100.0
	Hal+MCH1 0.1	7.1	0.68	97.5	0.4	0.07	92.2
	Hal+MCH1 1.0	7.3	1.21	101.0	0.3	0.08	73.7
	Hal+MCH1 10.0	6.2	0.96	85.8	0.3	0.10	87.9
Distancia	Sham+Veh	1566.5	544.52	-	1045.9	596.63	-
	Hal+Veh	2012.2	556.24	100.0	114.7	51.04	100.0
	Hal+MCH1 0.1	2004.2	189.95	99.6	105.9	21.28	92.4
	Hal+MCH1 1.0	2039.2	328.20	101.3	84.7	25.43	73.8
	Hal+MCH1 10.0	1764.6	235.99	87.7	101.0	28.89	88.1
Frecuencia de inmovilidad	Sham+Veh	63.8	45.04	-	39.2	42.54	-
	Hal+Veh	66.2	29.98	100.0	2.2	1.47	100.0
	Hal+MCH1 0.1	61.2	10.55	92.4	1.4	0.55	64.6
	Hal+MCH1 1.0	80.2	19.01	121.2	1.2	0.41	53.8
	Hal+MCH1 10.0	49.8	17.99	75.3	1.8	1.33	84.6
Cruce entre cuadrantes	Sham+Veh	15.2	8.42	-	8.0	8.74	-
	Hal+Veh	15.7	6.62	100.0	0.2	0.41	100.0
	Hal+MCH1 0.1	15.3	2.73	97.9	0.0	0.00	0.0
	Hal+MCH1 1.0	19.7	4.41	125.5	0.0	0.00	0.0
	Hal+MCH1 10.0	12.8	6.31	81.9	0.2	0.41	100.0

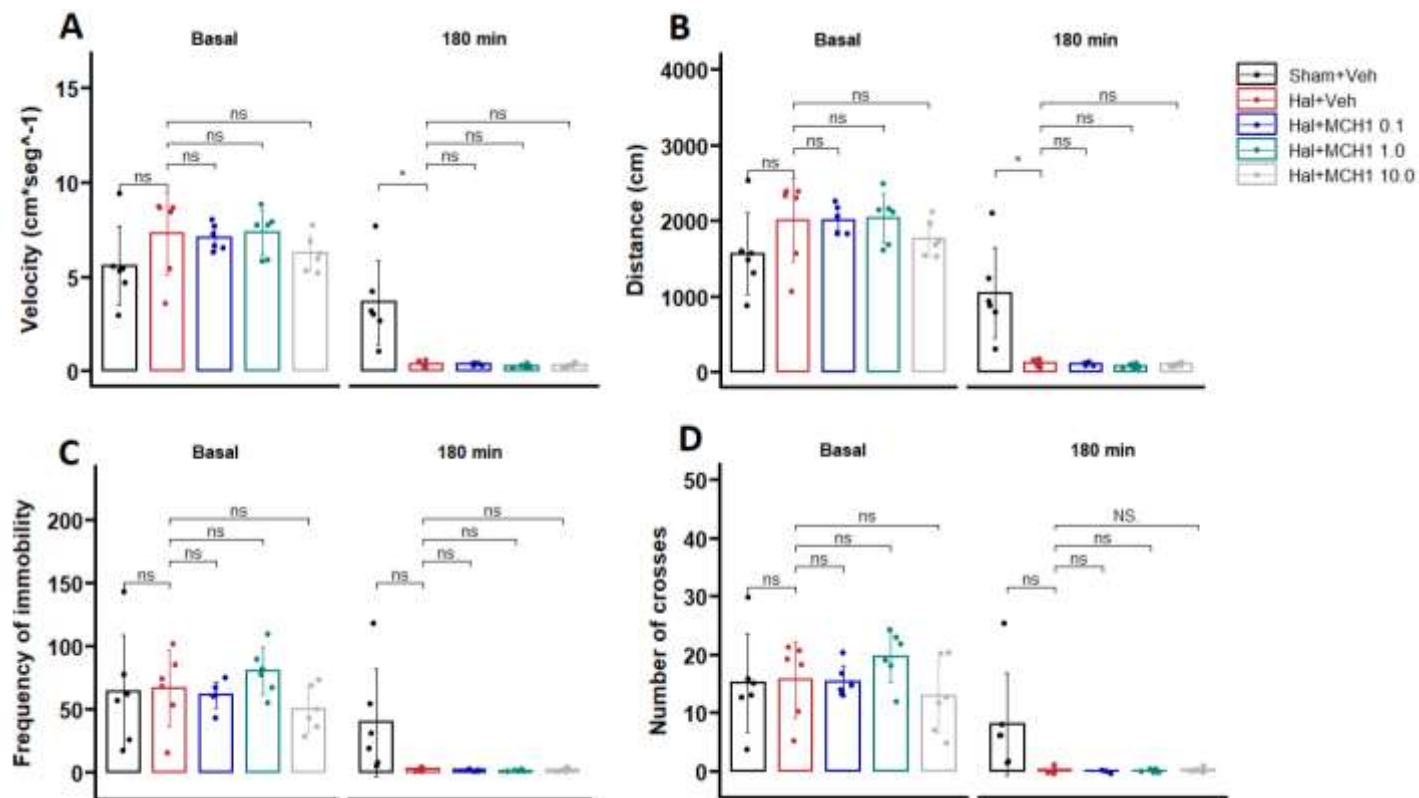


Figura 13. Prueba de campo abierto para evaluación motora. (A) Velocidad ambulatoria, (B) distancia ambulatoria total, (C) número de eventos de inmovilidad y (D) número de cruces. Se realizó una comparación estadística entre el grupo sham+Veh (control negativo) y Hal+Veh (control positivo) para la confirmación del modelo de haloperidol, y entre el grupo Hal+Veh (control positivo) y los grupos MCH1 a diferentes dosis para evaluar el efecto de MCH1. Los datos se presentan como media. *Nota:* *p<.05, ** p<.01 y *** p<.001.

3.1.2. Prueba de catalepsia

En primer lugar, la prueba confirmó el modelo de haloperidol a partir del minuto 60 pues se observó un nivel considerable de catalepsia superior a 20 segundos. Se confirmó el modelo en 23 ratas inyectadas con haloperidol y se rechazó en una. Esto se debe a que el animal mostraba un tiempo de inmovilidad de 0.45 segundos a los 180 minutos, mientras que las otras ratas inyectadas con haloperidol completaban los 60 segundos de inmovilidad. Los datos obtenidos del animal fueron excluidos. En segundo lugar, la prueba es un indicador de presencia de catalepsia mediante la duración de inmovilidad de la rata en la posición establecida.

Con respecto a la inmovilidad, se realizó la evaluación de supuestos de regresión simple encontrado no linealidad. Sin embargo, se encontró normalidad en la prueba de Shapiro-Wilk ($p=0.0603$). A partir de estos datos se usaron las pruebas paramétricas de ANOVA de dos vías de medias repetidas (**Tabla 5**). Este análisis se realiza con el grupo control positivo (vehículo) y no con el control negativo (haloperidol) porque se confirmó el modelo de parkinsonismo.

El ANOVA de dos vías para medias repetidas mostró diferencias significativas en la variable grupo ($p<0.001$), tiempo ($p<0.001$) y la relación entre ambas ($p<0.001$). A partir de estos datos se realizó la prueba post hoc de Dunn para especificar las diferencias específicas entre grupos experimentales.

En primer lugar, en el grupo basal no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, se encontraron diferencias altamente significativas entre los grupos haloperidol y vehículo desde en minuto 30 ($p=0.028$)

hasta el minuto 180 ($p=0.000$), por lo que se puede afirmar que el modelo funciona a partir del minuto 30 en adelante (**Tabla 5**).

Con respecto a los grupos experimentales, en el minuto 30 no muestran diferencias significativas con el grupo vehículo, e incluso, el grupo de 1mg/kg muestra diferencias significativas con el grupo haloperidol ($p=0.041$). Si se contabiliza como 100% de catalepsia al grupo haloperidol, se observa que el grupo de 1mg/kg solo genera 19.2% de catalepsia, seguido de 10mg/kg con 71.9%.

Asimismo, en el minuto 60 no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de 0.1mg/kg y 10mg/kg y el vehículo, acercándolos al mismo; más si con el grupo 1mg/kg ($p=0.015$). Se observa una disminuida catalepsia en el grupo 10mg/kg con 67%, seguido de 0.1mg/kg con 84%.

Finalmente, a partir del minuto 90 los grupos experimentales se diferencian significativamente del grupo vehículo y el porcentaje de catalepsia es similar al grupo haloperidol (**Figura 9**). A partir de los datos presentados se podría hipotetizar un retraso en el efecto de la catalepsia.

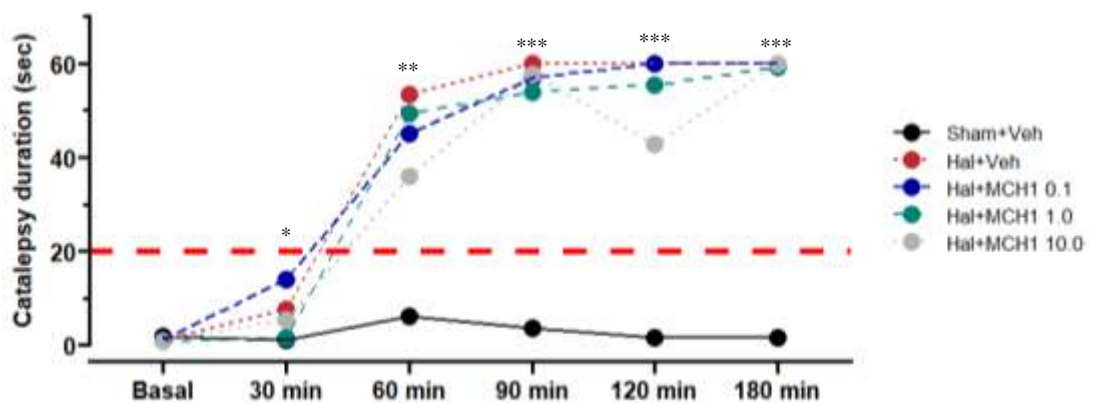


Figura 9. Duración en segundos de tiempo de catalepsia por grupos considerando 20 segundos como umbral de catalepsia (77). Los datos se presentan como medias. *Nota:* * $p<.05$, ** $p<.01$ y *** $p<.001$.

Posterior al análisis estadístico de ANOVA de dos vías, se decidió evaluar los datos también a nivel individual para identificar los cambios a nivel más específico. Para ello, en primer lugar se realizó la prueba de Grubbs para detectar valores atípicos encontrando dos datos atípicos: rata 7.3 en el minuto 30 ($p = 0.05$, $Z = 2.04$) y rata 2.1 en el minuto 60 ($p < 0.05$, $Z = 2.04$). Posteriormente se calculó la variación relativa con la fórmula: $Vr = (t2/t1)*100$ para la realización de los gráficos lineales considerando el tiempo directamente anterior.

La **figura 10** muestra 5 gráficos que representan los grupos. Asimismo, el basal es un 100% (0) y el siguiente tiempo (30 minutos) en su porcentaje respecto al mismo, el tiempo de 60 minutos respecto al de 30 minutos, y consecutivamente (Figura 10). Se observa que los valores del grupo vehículo se mantienen, reflejando la ausencia de influencia de la inyección intraperitoneal en sí misma. En el grupo haloperidol se observa una alta variación de catalepsia en todas las ratas, siendo la mayor variación (4 ratas) a los 30 minutos con una variación relativa de hasta 1890.2% (**figura 10**). En contraposición, los grupos administrados con 0.1mg/kg y 1mg/kg muestran la mayor variación a los 60 minutos con una variación relativa de hasta 8219.2%, demostrando un retraso en la aparición de la catalepsia por la alta diferencia con el minuto 30 en donde la variación relativa no supera 290% en ninguno de los dos grupos. Esto va acorde a lo encontrado en los resultados estadísticos del test de Dunn pues a los 30 minutos el grupo de 1mg/kg muestra diferencias significativas con el grupo haloperidol ($p=0.041$).

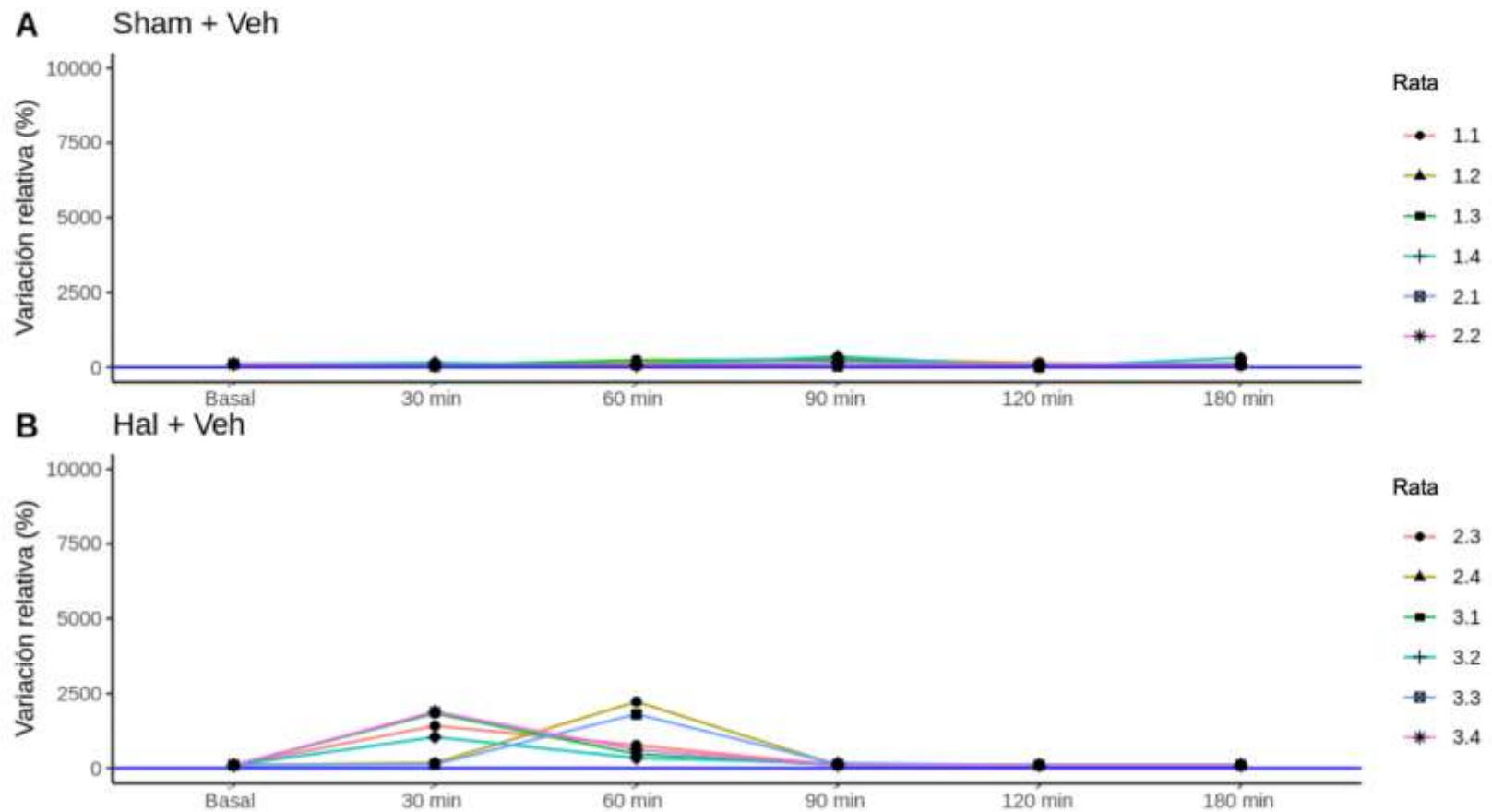


Figura 10. Gráficos inividual de variación relativa de catalepsia con la fórmula: $Vr = (t2/t1)*100$. (A) Grupo sham y vehiculo y (B) grupo haloperidol y vehículo.

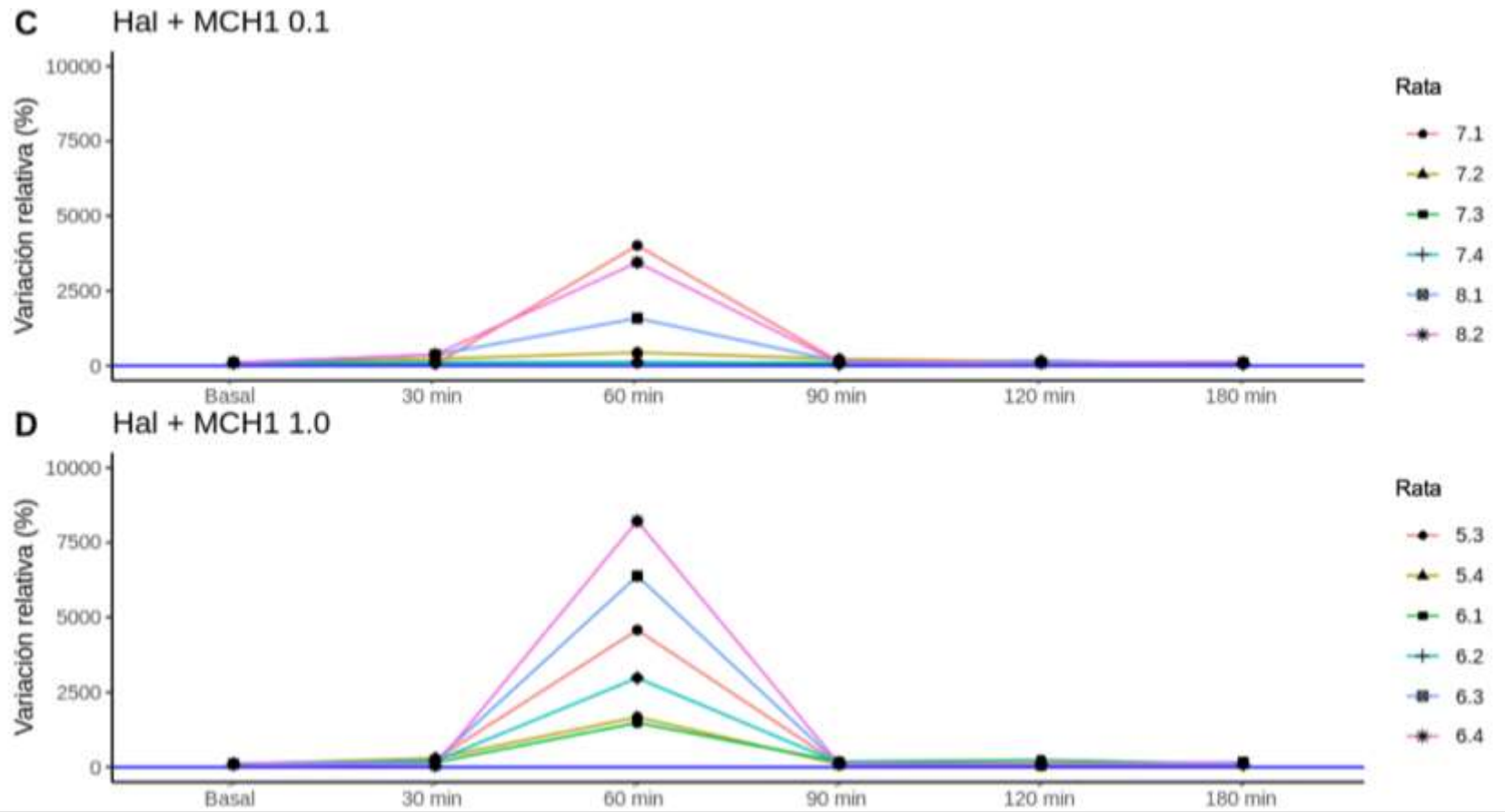


Figura 11. Gráficos inividual de variación relativa de catalepsia con la fórmula: $Vr = (t2/t1)*100$. **(C)** grupo haloperidol y macamida de 0.1mg y **(D)** grupo haloperidol y macamida de 1mg.

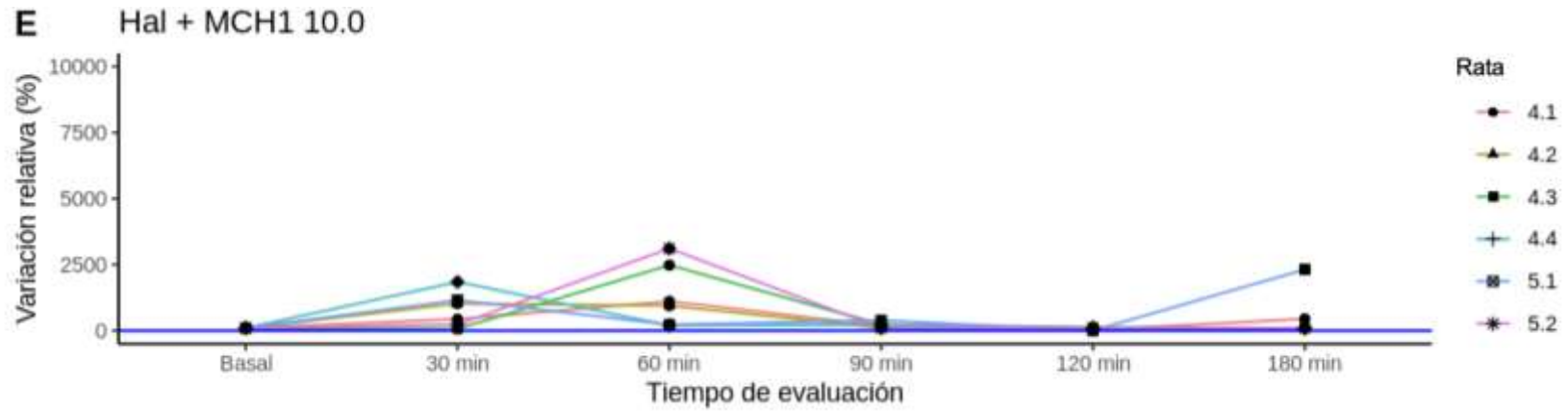


Figura 12. Gráficos invididual de variación relativa de catalepsia con la fórmula: $Vr = (t2/t1)*100$. **(E)** grupo haloperidol y macamida de 10mg.

Tabla 5. Duración de inmovilidad en la prueba de catalepsia

Grupo	Basal			30 min			60 min			90 min			120 min			180 min		
	media	sd	%	media	sd	%	media	sd	%	media	sd	%	media	sd	%	media	sd	%
Sham+Veh	1.8	1.24	-	1.1	0.33	-	6.0	12.38	-	3.7	3.12	-	1.6	1.77	-	1.5	0.65	-
Hal+Veh	1.0	0.56	100.0	7.7	4.22	100.0	53.5	10.45	100.0	60.0	0.00	100.0	60.0	0.00	100.0	60.0	0.00	100.0
Hal+MCH1 0.1	1.1	0.64	108.1	14.0	25.75	183.0	44.9	16.41	84.0	57.0	6.80	94.9	60.0	0.00	100.0	60.0	0.00	100.0
Hal+MCH1 1.0	0.9	0.45	82.3	1.5	1.08	19.2	49.2	19.01	92.0	54.0	14.70	90.0	55.4	9.66	92.4	59.2	2.00	98.6
Hal+MCH1 10.0	0.8	0.22	75.8	5.5	4.88	71.9	35.9	19.65	67.0	57.8	5.43	96.3	42.7	27.07	71.1	60.0	0.00	100.0

Tabla 6. ANOVA de dos vías de muestras relacionadas

Variables	P
Grupo	0.00
Tiempo	0.00
Grupo*tiempo	0.00

3.1.3. Prueba de suspensión de alambre

La fuerza neuromuscular a nivel musculo-esquelético e integridad de la neurona motora fue medida mediante el tiempo de mantenimiento en suspensión del alambre. Al evaluar los datos de suspensión, se encontró ausencia de normalidad en la prueba de Shapiro-Wilk ($p=0.019$). Se usó la prueba paramétricas de ANOVA de dos vías de muestras repetidas (Tabla 3). El ANOVA mostró diferencias significativas en la variable grupo ($p<0.001$), tiempo ($p<0.001$) y la relación entre ambas ($p<0.001$). A partir de estos datos se realizó la prueba post hoc de Dunn para especificar las diferencias específicas entre grupos experimentales.

Con respecto al grupo haloperidol, similar a la prueba anterior, el modelo se confirma por el aumento y constancia de la rigidez muscular a partir del minuto 60 (**Figura 10**).

En primer lugar, en el grupo basal y 30 minutos no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Posteriormente, si bien los grupos experimentales no mostraron diferencias significativas con el grupo vehículo. En el minuto 60 se mostraron diferencias entre los grupos administrados con 0.1 y 1mg/kg ($p=0.045$) y el grupo haloperidol con el grupo 0.1mg/kg ($p=0.004$). En el minuto 90 se encontraron diferencias significativas entre el grupo haloperidol y la dosis de 1mg/kg (0.002). En el minuto 120 se encontraron diferencias entre el grupo haloperidol y las dosis de 0.1mg/kg ($p=0.03$) y 1mg/kg ($p=0.02$). Finalmente, en el minuto 180 se encontraron diferencias entre el grupo haloperidol y las dosis de 0.1mg/kg ($p=0.000$) y 10mg/kg ($p=0.033$). Se esperaba que los puntajes de los grupos experimentales disminuyan acercándose al grupo vehículo, sin embargo estos presentan puntajes incluso más bajos que los del vehículo; lo que implicaría

un efecto significativo en la reducción de fuerza pero que no es similar al vehículo en su totalidad.

En comparación al grupo de haloperidol, en el minuto 60 hay diferencia significativa con el grupo de 0.1mg/kg con un 71% de reducción de rigidez; en el minuto 90, con el grupo 1mg/kg con un 72% de reducción; en el minuto 120, con el grupo 0.1 y 1mg/kg, con 58.5% de reducción en ambos; y en el minuto 180 con los grupos 0.1 y 10mg/kg con 80% y 76.3% de reducción respectivamente (Tablas 7 y 8).

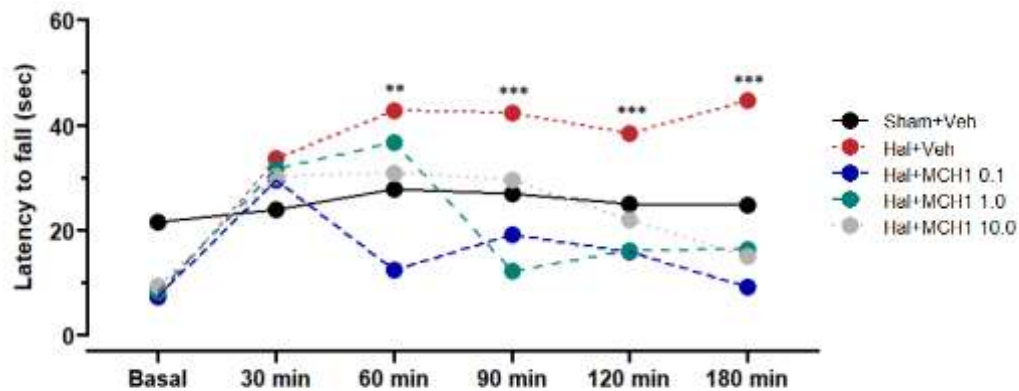


Figura 13. Duración en segundos de tiempo de suspensión por grupos. Se realizó una comparación estadística (ANOVA unidireccional) entre el grupo Hal+Veh (control positivo) y los grupos MCH1 a diferentes dosis. Los datos se presentan como media. *Nota:* * $p < .05$, ** $p < .01$ y *** $p < .001$.

Al igual que con los resultados de catalepsia, se evaluaron los datos a nivel individual con la variación relativa (**Figura 12**). En congruencia con los datos estadísticos presentados existe alta variación en todos los grupos administrados con haloperidol en comparación al grupo sham presentando variaciones incluso hasta el minuto 90. Se observa que la mayor variabilidad se da al minuto 30 para todos los

grupos. Mientras que los grupos 0.1 y 10mg/kg continúan mostrando variabilidad significativa hasta el minuto 90.

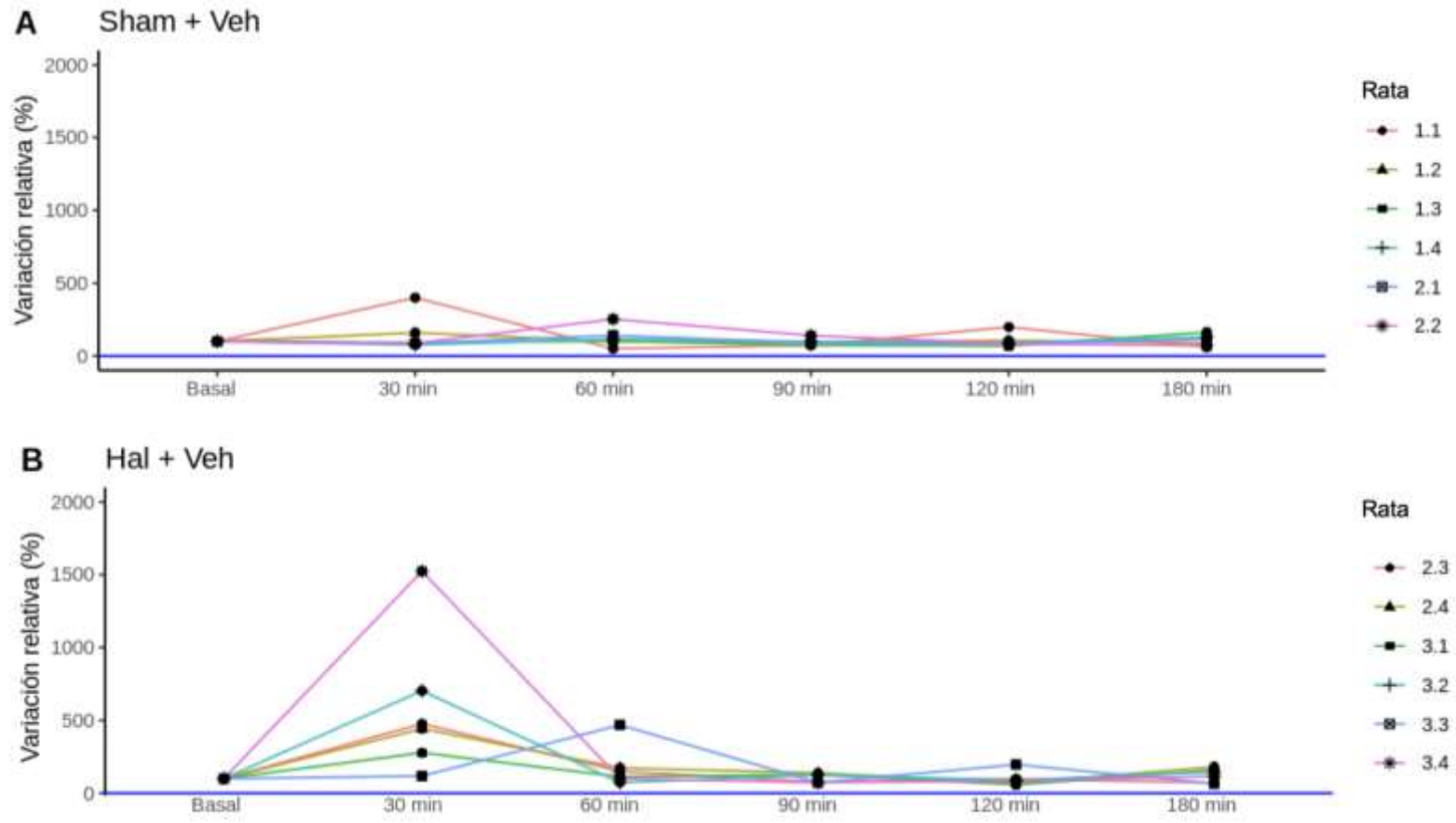


Figura 14. Gráficos invidual de variación relativa de tiempo de suspensión con la fórmula: $V_r = (t_2/t_1) \cdot 100$. (A) Grupo sham y vehiculo y (B) grupo haloperidol y vehículo.

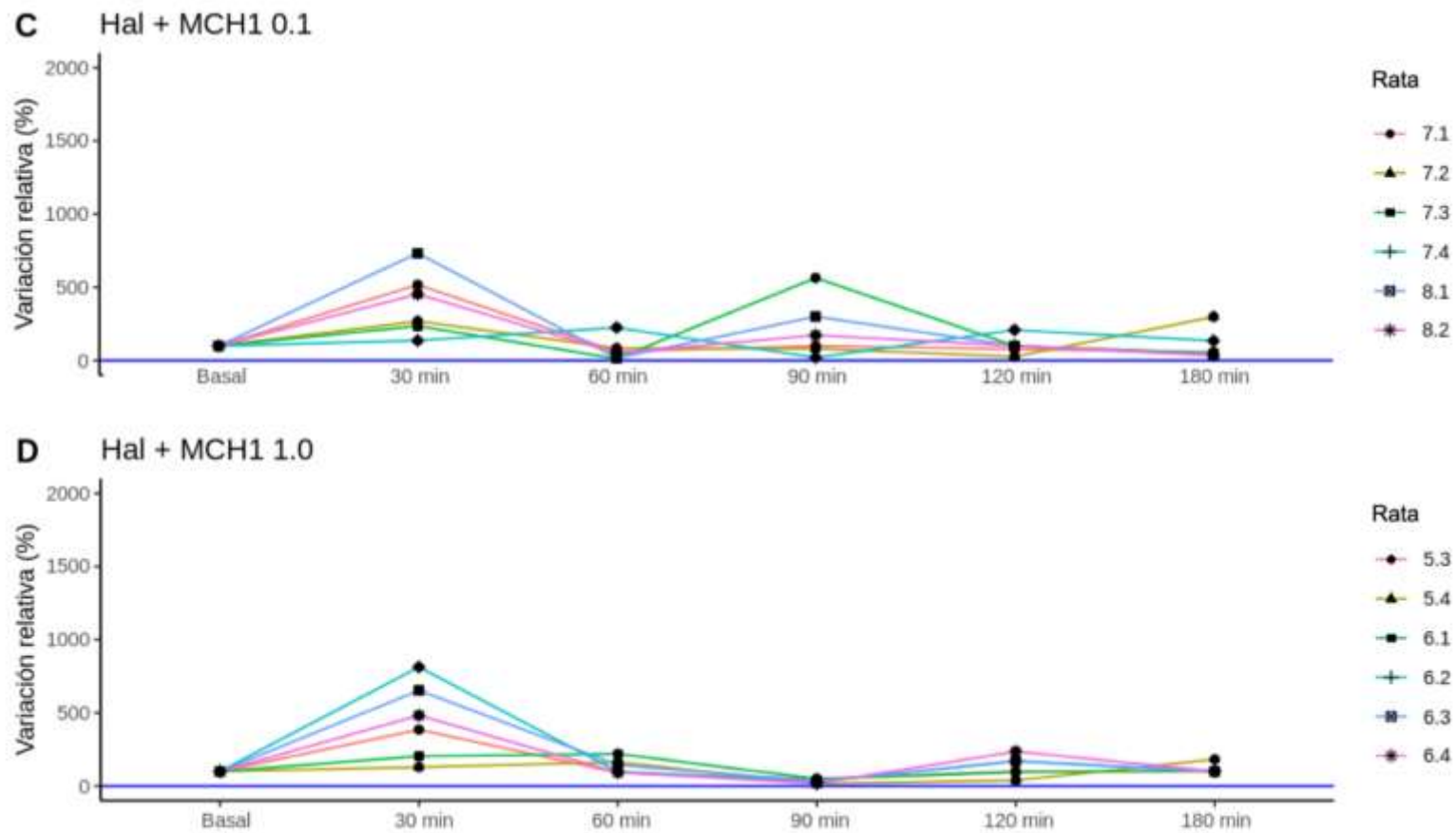


Figura 15. Gráficos individual de variación relativa de tiempo de suspensión con la fórmula: $V_r = (t_2/t_1) \cdot 100$. (C) grupo haloperidol y macamida de 0.1mg y(D) grupo haloperidol y macamida de 1mg.

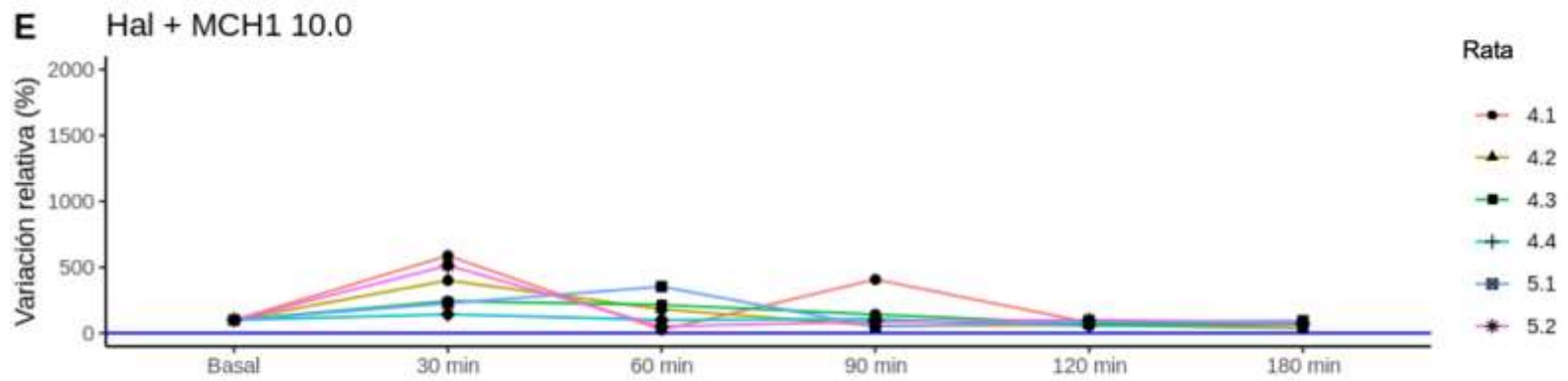


Figura 16. Gráficos invidual de variación relativa de tiempo de suspensión con la fórmula: $Vr = (t2/t1)*100$. **(E)** grupo haloperidol y macamida de 10mg.

Tabla 7. Duración de sostenimiento en la prueba de suspensión en alambre

Grupo	Basal			30 min			60 min			90 min			120 min			180 min		
	mean	sd	%	mean	sd	%	mean	sd	%	mean	sd	%	mean	sd	%	mean	sd	%
Sham+Veh	21.5	12.65	-	23.9	9.57	-	27.8	14.14	-	27.0	15.16	-	25.0	11.46	-	24.7	12.14	-
Hal+Veh	7.2	4.11	100.0	33.7	18.68	100.0	42.7	9.90	100.0	42.3	11.03	100.0	38.3	10.89	100.0	44.7	13.80	100.0
Hal+MCH1 0.1	7.3	2.98	102.3	29.6	6.64	87.8	12.4	7.55	29.0	19.2	1.79	45.4	15.9	6.85	41.5	9.1	2.21	20.4
Hal+MCH1 1.0	8.3	3.41	116.0	31.6	16.20	93.8	36.7	9.52	86.1	12.2	6.66	28.7	16.0	7.38	41.7	16.4	7.05	36.6
Hal+MCH1 10.0	9.4	6.59	131.4	30.1	18.63	89.3	30.8	16.58	72.2	29.6	8.13	70.1	21.8	5.76	57.0	15.1	5.66	33.7

Tabla 8. ANOVA de dos vías de muestras relacionadas

Variables	P
Grupo	0.00
Tiempo	0.00
Grupo*tiempo	0.00

V. DISCUSIÓN

La presente investigación encontró que la administración intraperitoneal de MACOMCH-01 reduce los síntomas parkinsonianos en el comportamiento de ratas Sprague Dawley inducidas al modelo de haloperidol y administradas con dosis de 0.1mg/kg y 1mg/kg y 10mg/kg. Estos datos se obtuvieron mediante la prueba comportamental de catalepsia, prueba de suspensión en alambre y campo abierto. En esta sección se retomarán los resultados del experimento que cumplen con los objetivo.

En primer lugar, los resultados de la prueba de campo abierto concuerdan con los resultados de las demás pruebas comportamentales con resultados altamente significativos entre el grupo vehículo y el grupo de haloperidol. La prueba de campo abierto es un test ampliamente usado por la facilidad de aplicación y principalmente para medir locomoción en roedores (78), por lo que estos datos confirman el modelo de parkinsonismo del haloperidol por mostrar menos desempeño locomotor en el grupo haloperidol a los 180 minutos.

Si bien existe evidencia que inhibidores de FAAH producen efectos en la locomoción aumentando la distancia recorrida (79), la ausencia de diferencias entre el grupo haloperidol y los grupos experimentales en el presente estudio también ha sido encontrada en otras investigaciones (80, 81). Incluso se han encontrados efectos opuestos dependiendo de la concentración y dosis de los agonistas cannabinoides (82, 83). Esto podría evidenciar que los agonistas cannabinoides y los inhibidores de FAAH influyen en el movimiento de manera dosis-dependiente.

Con respecto a la prueba de catalepsia, los resultados evidencian un retraso en el efecto cataléptico del haloperidol por la administración intraperitoneal de

(9Z,12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida o N-bencilinoleamida (MACOMCH-01). Esto se expresa de manera distinta de acuerdo a la dosis administrada; en el caso de la dosis de 1mg/kg existen diferencias significativas al minuto 30 con el grupo haloperidol y a los 60 minutos ya existen diferencias con el grupo vehículo; mientras que en el caso de 0.1 y 10mg/kg las diferencias significativas empiezan en el minuto 90 con el grupo vehículo.

En la misma línea, los grupos administrados con 0.1mg/kg y 1mg/kg muestran la mayor variación a los 60 minutos con una variación relativa de hasta 8219.2%, demostrando un retraso en la aparición de la catalepsia por la alta diferencia con el minuto 30 en donde la variación relativa no supera 290% en ninguno de los dos grupos. Esto va acorde a lo encontrado en los resultados estadísticos del test de Dunn pues a los 30 minutos el grupo de 1mg/kg muestra diferencias significativas con el grupo haloperidol ($p=0.041$). Esto implicaría que la dosis de 1mg/kg genera un efecto a corto plazo (30 minutos) y la de 0.1mg/kg y 10mg/kg un efecto a mediano plazo (60 minutos).

Se considerarán para la discusión estudios de inhibidores FAAH, tomando en cuenta estudios *in-vitro* que demuestran a la macamida (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida ($C_{25}H_{39}NO$) como inhibidor de FAAH (19,24), Celorrio et al. realizó un estudio con URB597 y síntomas parkinsonianos, encontrando una disminución significativa de estos últimos ante la administración (84). Sin embargo, no encontró aumento de neuronas dopaminérgicas en el estriado ni sustancia negra, lo que implicaría que los inhibidores FAAH no actúan como neuroprotectores a nivel de la vía nigro estriatal. En la misma línea, se un aumento

significativo de anandamidas (AEA) en el cerebelo y tronco encefálico que se asocian directamente con receptores CB1 y CB2 (85).

El estudio mencionado se complementa con uno del 2021 con el mismo fármaco (URB597), comprobando que la administración del inhibidor FAAH disminuye la activación de CB1 y reduce significativamente la discinesia, que es un síntoma motor del parkinson que se presenta junto a la catalepsia y también es generado ante la inhibición de endocannabinoides (86,87). En lo sucesivo, al ser el URB597 un generador endógeno de anandamida, no se encuentran los efectos adversos de la administración de cannabinoides exógenos como afectación del sistema inmunológico y cognitivo (88). En adición, se han realizado pruebas *in vivo* con otros compuestos inhibidores de FAAH, reafirmando el aumento de anandamida en el cerebro (21,22).

En este punto es importante mencionar que si bien el haloperidol actúa a nivel de D2, también se ha comprobado el aumento del receptor CB1 después de la administración del mismo, cuyos efectos se asocian directamente a la generación de catalepsia y discinesia (87). En complementariedad, el sistema endocannabinoide es uno de los moduladores de la señalización de dopamina en los ganglios basales (89).

Otro dato importante es el efecto de la dosis, pues la de 1mg/kg muestra efectos más significativos a corto plazo (60 min), mientras que la dosis más baja y alta muestran efecto a mayor plazo (90 min). Estos resultados muestran una curva de respuesta dosis-dependiente en forma de campana que se ha observado también en otras investigaciones con inhibidores FAAH (90 - 92). Si bien se espera en los fármacos una respuesta lineal, la forma en campana está asociada a la activación

del receptor cannabinoide 1y la activación de TRPV1 (receptor de potencial transitorio V1) ante dosis altas (90, 92). Aunque se ha demostrado que el TRPV1 no está directamente relacionado a la reducción de catepsia (84).

Por otro lado, también se observa que desde el minuto 120 los resultados ya no muestran variabilidad, lo que podría relacionarse con un estudio en roedores demuestran que el nivel máximo de presencia del haloperidol en el estriado se da 2 horas posteriores a la inyección (93). Esto podría explicar que la dosis de haloperidol en su máxima presencia disminuyó los efectos de la macamida, igualando los resultados de los grupos experimentales y diferenciandolos significativamente del grupo vehículo. Otro posible factor para la pérdida del efecto o tiempo de acción son variables metabolizadoras como las enzimas o el citocromo (94).

Analizando estudios con resultados que apoyan los de esta investigación, se confirmó la actividad antioxidante mediante el método DPPH del extracto de *Lepidium meyenii* (29). Asimismo, otros compuestos antioxidantes como el de Kabra et al. encontraron disminución del efecto catatónico en animales administrados con *Myrica esulenta*, manteniendose estas diferencias desde los 30 hasta los 180 minutos y correlacionando con la cantidad de droga administrada. En ese estudio se usaron dosis de 50, 100 y 200mg/kg y un pre tratamiento de 7 días, cantidades significativamente mayores a las usadas en el presente experimento (3). Asimismo, un estudio con *Beta vulgaris* mostró resultados similares dosis dependientes (95).

Retomando la discusión de los resultados, la prueba de suspensión de alambre busca evaluar fuerza muscular por el tiempo que se mantiene sostenido en

el alambre. La prueba es ampliamente usada en estudios con haloperidol, mostrando en los resultados mayor tiempo de suspensión en el grupo vehículo en comparación al grupo haloperidol (6,11).

Se encontró en el minuto 60 ,71% de disminución de fuerza muscular en el grupo 0.1mg/kg; en el minuto 90, 70% de reducción en el grupo 1mg/kg; en el minuto 120, 58.5% de reducción en los grupos 0.1mg/kg y 1mg/kg; y en el minuto 180, 80% y 76.3% de reducción en los grupos 0.1 y 10mg/kg respectivamente.

Estos resultados son opuestos a los obtenidos con compuestos neuroprotectores antioxidantes, evidenciando menor tiempo de suspensión en grupos que recibieron el compuesto cuando se suele obtener un mayor tiempo de suspensión en ausencia de haloperidol (3). Incluso, los grupos experimentales muestran constantes puntajes debajo del grupo vehículo implicando menor fuerza muscular. Sin embargo, no se han realizado estudios con esta prueba comportamental en inhibidores FAAH.

Si bien estos resultados impresionan ser contrarios a lo esperado por la reducción de fuerza muscular en los grupos experimentales, es importante recalcar dos características importantes de los resultados. En primer lugar, los resultados son significativos y consistentes en el tiempo, indicando diferencia estable de los grupos experimentales y, por lo tanto, confirmando un efecto de la macamida sintética. Asimismo, los resultados son coherentes con los de la prueba de catalepsia confirmando el efecto de la rigidez muscular del haloperidol por las diferencias significativas con el grupo vehículo a partir del minuto 60.

En segundo lugar, este resultado está referido a la fuerza muscular, no al tono muscular; la reducción de este último implica catalepsia. La fuerza muscular

se genera desde las neuronas motoras mediante las fibras musculares y su efecto se da en la contracción del músculo por acción de la acetilcolina; mientras mayor sea la frecuencia de potenciales de acción, mayor será la fuerza percibida en la contracción muscular (96). Por otro lado, el tono muscular está regido por áreas subcorticales como el tronco encefálico y ganglios basales; áreas afectadas en la EP en las primeras fases (96,97). El modelo agudo de parkinsonismo podría explicar la no afectación de áreas corticales pues el efecto del haloperidol se da a nivel de receptores D2, asociados principalmente a áreas subcorticales (98).

En la misma línea, la reducción de la fuerza muscular podría estar influenciada por el aumento de endocannabinoides ante la presencia de inhibidores FAAH. Esto se debe a que, según estudios, podrían actuar directamente en la regulación de la transmisión neuromuscular ajustando los niveles de acetilcolina y limitando la comunicación eléctrica de la contracción muscular (99,100).

Los resultados de la presente investigación concluyen que la macamida sintética (9Z, 12Z)-N-benciloctadeca-9,12-dienamida retrasa el efecto cataléptico y disminuye la fuerza muscular en ratas inducidas a síntomas parkinsonianos mediante el modelo agudo de haloperidol. Estos resultados se podría explicar principalmente por el incremento de biodisponibilidad de endocannabinoides en el cerebro por inhibición del FAAH.

Por otro lado, es importante resaltar las limitaciones del modelo. La principal limitación recae en la característica aguda y reversible del modelo. Si bien los modelos agudos son usados para obtener datos iniciales de referencia, el modelo agudo de haloperidol genera síntomas parkinsonianos reversibles, diferenciándose de los efectos neurodegenerativos del parkinson (6). Asimismo, el tiempo

disponible para la realización de las pruebas comportamentales es escaso y limita las mismas a un número menor lo que dificulta los análisis estadísticos y la replicabilidad.

Finalmente, con respecto a las hipótesis de mecanismos de acción, se debe considerar que la complejidad del sistema del ser vivo podría implicar otras vías fuera de la cannabinoide por lo que el uso de antagonistas de receptores endocannabinoides como controles negativos podrían servir para confirmar la hipótesis.

Se recomienda realizar estudios crónicos a futuro con modelos como la 6OHDA para implementar modelos genéticos y moleculares. En la misma línea, modelos de biodisponibilidad para distintas dosis aplicadas pueden ser útiles para comprender el mecanismo de la droga como, por ejemplo, con el uso de bombas osmóticas. Asimismo, se recomienda replicar el experimento con un grupo control administrado con rimonabant para comprobar el efecto a nivel de receptor CB1 y considerar un grupo de ratas hembras. Por otro lado, se podría hacer uso de pruebas comportamentales como la prueba de la rejilla, de mesa y plano inclinado, siendo las más usadas después de las mencionadas en esta investigación en un 14.5%, 1.57% y 0.39% de estudios (25).

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martínez-Fernández. R, Gasca-Salas C. C, Sánchez-Ferro Á, Ángel Obeso J. Actualización en la enfermedad de Parkinson. Rev Médica Clínica Las Condes. 2016;27(3):363-79.
2. García, F. Carrillo. Enfermedad de Parkinson y parkinsonismos. Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2019;12(73):4273-84.
3. Kabra A, Baghel US, Hano C, Martins N, Khalid M, Sharma R. Neuroprotective potential of Myrica esulenta in Haloperidol induced Parkinson's disease. J Ayurveda Integr Med. 2020;11(4):448-54.
4. Acharya S, Kim KM. Roles of the Functional Interaction between Brain Cholinergic and Dopaminergic Systems in the Pathogenesis and Treatment of Schizophrenia and Parkinson's Disease. Int J Mol Sci. 2021;22(9):4299.
5. Llibre-Guerra JJ, Prina M, Sosa AL, Acosta D, Jimenez-Velazquez IZ, Guerra M, et al. Prevalence of parkinsonism and Parkinson disease in urban and rural populations from Latin America: A community based study. Lancet Reg Health Am. 2022;7(100136):100136.
6. Waku I, Magalhães MS, Alves CO, de Oliveira AR. Haloperidol-induced catalepsy as an animal model for parkinsonism: A systematic review of experimental studies. Eur J Neurosci. 2021;53(11):3743-67.
7. Mutică M, Marinescu I, Militaru F, Pîrlog MC, Udriștoiu I. Clinical and biological outcomes of prolonged treatment with haloperidol in schizophrenia. Romanian J Morphol Embryol Rev Roum Morphol Embryol. 2016;57(2):477-81.
8. Kajero JA, Seedat S, Ohaeri J, Akindele A, Aina O. Investigation of the effects of cannabidiol on vacuous chewing movements, locomotion, oxidative

- stress and blood glucose in rats treated with oral haloperidol. *World J Biol Psychiatry*. 2020;21(8):612-26.
9. Stahl SM. Beyond the dopamine hypothesis of schizophrenia to three neural networks of psychosis: dopamine, serotonin, and glutamate. *CNS Spectr*. 2018;23(3):187-91.
 10. Duma SR, Fung VS. Drug-induced movement disorders. *Aust Prescr*. 2019;42(2):56-61.
 11. Bai T, Wang S, Zhao Y, Zhu R, Wang W, Sun Y. Haloperidol, a sigma receptor 1 antagonist, promotes ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;491(4):919-25.
 12. de Ryck M, Teitelbaum P. Morphine catalepsy as an adaptive reflex state in rats. *Behav Neurosci*. 1984;98:243-61.
 13. Lorenc-Koci E, Wolfarth S, Ossowska K. Haloperidol-increased muscle tone in rats as a model of parkinsonian rigidity. *Exp Brain Res*. 1996;109(2):268-76.
 14. De Virgilio A, Greco A, Fabbrini G, Inghilleri M, Rizzo MI, Gallo A, et al. Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. *Autoimmun Rev*. 2016;15(10):1005-11.
 15. Fernández-Ruiz J, Romero J, Ramos JA. Endocannabinoids and Neurodegenerative Disorders: Parkinson's Disease, Huntington's Chorea, Alzheimer's Disease, and Others. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;231:233-59.
 16. van der Stelt M, Di Marzo V. Cannabinoid receptors and their role in neuroprotection. *Neuromolecular Med*. 2005;7(1-2):37-50.
 17. Price DA, Martinez AA, Seillier A, Koek W, Acosta Y, Fernandez E, et al.

- WIN55,212-2, a cannabinoid receptor agonist, protects against nigrostriatal cell loss in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci.* 2009;29(11):2177-86.
18. García MC, Cinquina V, Palomo-Garo C, Rábano A, Fernández-Ruiz J. Identification of CB2 receptors in human nigral neurons that degenerate in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2015;587:1-4.
19. Alasmari MM, Böhlke M, Kelley C, Maher T, Pino-Figueroa A. Inhibition of Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) by Macamides. *FASEB J.* 2018;32(S1):825.8-825.8.
20. Boger DL, Miyauchi H, Du W, Hardouin C, Fecik RA, Cheng H, et al. Discovery of a Potent, Selective, and Efficacious Class of Reversible α -Ketoheterocycle Inhibitors of Fatty Acid Amide Hydrolase Effective as Analgesics. *J Med Chem.* 2005;48(6):1849-56.
21. Wang DP, Kang K, Sun J, Lin Q, Lv QL, Hai J. URB597 and Andrographolide Improve Brain Microvascular Endothelial Cell Permeability and Apoptosis by Reducing Oxidative Stress and Inflammation Associated with Activation of Nrf2 Signaling in Oxygen-Glucose Deprivation. *Oxid Med Cell Longev.* 2022;2022:4139330.
22. Gunduz-Cinar O, Hill MN, McEwen BS, Holmes A. Amygdala FAAH and anandamide: mediating protection and recovery from stress. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(11):637-44.
23. Chirif AC. Biodiversidad amazónica y gastronomía regional. *Folia Amaz.* 2005;14(2):91-8.
24. Wu H, Kelley CJ, Pino-Figueroa A, Vu HD, Maher TJ. Macamides and

- their synthetic analogs: evaluation of in vitro FAAH inhibition. *Bioorg Med Chem.* 2013;21(17):5188-97.
25. Dini A, Migliuolo G, Rastrelli L, Saturnino P, Schettino O. Chemical composition of *Lepidium meyenii*. *Food Chem.* 1994;49(4):347-9.
26. Zhou Y, Li P, Brantner A, Wang H, Shu X, Yang J, et al. Chemical profiling analysis of Maca using UHPLC-ESI-Orbitrap MS coupled with UHPLC-ESI-QqQ MS and the neuroprotective study on its active ingredients. *Sci Rep.* 2017;7:44660.
27. Gugnani KS, Vu N, Rondón-Ortiz AN, Böhlke M, Maher TJ, Pino-Figueroa AJ. Neuroprotective activity of macamides on manganese-induced mitochondrial disruption in U-87 MG glioblastoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2018;340:67-76.
28. Chain F, Iramain MA, Grau A, Catalán CAN, Brandán SA. Evaluation of the structural, electronic, topological and vibrational properties of N-(3,4-dimethoxybenzyl)-hexadecanamide isolated from Maca (*Lepidium meyenii*) using different spectroscopic techniques. *J Mol Struct.* 2017;1128:653-64.
29. Fu L, Wei J, Gao Y, Chen R. Antioxidant and antitumoral activities of isolated macamide and macaene fractions from *Lepidium meyenii* (Maca). *Talanta.* 2021;221:121635.
30. Saavedra Moreno JS, Millán PA, Buriticá Henao OF, Saavedra Moreno JS, Millán PA, Buriticá Henao OF. Introducción, epidemiología y diagnóstico de la enfermedad de Parkinson. *Acta Neurológica Colomb.* 2019;35:2-10.
31. Martínez-Fernández R, Schmitt E, Martinez-Martin P, Krack P. The hidden sister of motor fluctuations in Parkinson's disease: A review on nonmotor

- fluctuations. *Mov Disord.* 2016;31(8):1080-94.
32. Aarsland D, Creese B, Politis M, Chaudhuri KR, Ffytche DH, Weintraub D, et al. Cognitive decline in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol.* 2017;13(4):217-31.
33. Bohnen NI, Albin RL. The cholinergic system and Parkinson disease. *Behav Brain Res.* 2011;221(2):564–73.
34. Roller WC, Glatt S, Vetere-Overfield B, Hassanein R. Falls and Parkinson’s Disease. *Clin Neuropharmacol.* 1989;12(2):98.
35. Prosser ES, Csernansky JG, Kaplan J, Thiemann S, Becker TJ, Hollister LE. Depression, Parkinsonian Symptoms, and Negative Symptoms in Schizophrenics Treated With Neuroleptics. *J Nerv Ment Dis.* 1987;175(2):100.
36. Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkman J, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primer.* 2017;3:17013.
37. Schapira AHV, Gegg M. Mitochondrial Contribution to Parkinson’s Disease Pathogenesis. Simon DK, editor. *Park Dis.* 2011;2011:159160.
38. Wei Z, Li X, Li X, Liu Q, Cheng Y. Oxidative Stress in Parkinson’s Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Mol Neurosci.* 2018;11.
39. Chen X, Guo C, Kong J. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res.* 2012;7(5):376-85.
40. Lesage S, Brice A. Role of Mendelian genes in “sporadic” Parkinson’s disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 2012;18:S66-70.
41. Soldner F, Stelzer Y, Shivalila CS, Abraham BJ, Latourelle JC, Barrasa MI, et al. Parkinson-associated risk variant in enhancer element produces subtle effect on target gene expression. *Nature.* 2016;533(7601):95.

42. Church FC. Treatment options for motor and non-motor symptoms of Parkinson's disease. *Biomolecules*. 2021;11(4):612.
43. Müller T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa/carbidopa cotherapies for Parkinson's disease. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2020;16(5):403-14.
44. Liu C. Targeting the cholinergic system in Parkinson's disease. *Acta Pharmacol Sin*. 2020;41(4):453-63.
45. Sian J, Youdim MBH, Riederer P, Gerlach M. MPTP-Induced Parkinsonian Syndrome. *Basic Neurochem Mol Cell Med Asp 6th Ed* [Internet]. 1999
46. Simola N, Morelli M, Carta AR. The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Neurotox Res*. 1 de septiembre de 2007;11(3):151-67.
47. Alam M, Schmidt WJ. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. *Behav Brain Res*. 17 de octubre de 2002;136(1):317-24.
48. Cavanna AE. Parkinson Disease. En: Cavanna AE, editor. *Motion and Emotion: The Neuropsychiatry of Movement Disorders and Epilepsy* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [citado 4 de septiembre de 2019]. p. 83-91. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-89330-3_7
49. Gomperts SN. Lewy Body Dementias: Dementia With Lewy Bodies and Parkinson Disease Dementia. *Contin Lifelong Learn Neurol*. abril de 2016;22(2 Dementia):435-63.
50. Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol*

Aging. 1 de marzo de 2003;24(2):197-211.

51. Marín M DS, Carmona V H, Ibarra Q M, Gámez C M. Enfermedad de Parkinson: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. Rev Univ Ind Santander Salud. 15 de febrero de 2018;50(1):79-92.

52. Struzyna LA, Browne KD, Brodник ZD, Burrell JC, Harris JP, Chen HI, et al. Tissue engineered nigrostriatal pathway for treatment of Parkinson's disease. J Tissue Eng Regen Med. 2018;12(7):1702-16.

53. Rice ME, Cragg SJ. Dopamine spillover after quantal release: Rethinking dopamine transmission in the nigrostriatal pathway. Brain Res Rev. 1 de agosto de 2008;58(2):303-13.

54. Arias-Carrión A. Enfermedad de Parkinson y neurogénesis. Arch Med. 3(4):0-0.

55. Ostrosky-Solis F. Características neuropsicológicas de la enfermedad de Parkinson. Rev Neurol. 2000;30(8):788-96.

56. Chinta SJ, Andersen JK. Dopaminergic neurons. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(5):942-6.

57. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem. 1992;59(5):1609-23.

58. Elsworth JD, Roth RH. Dopamine Synthesis, Uptake, Metabolism, and Receptors: Relevance to Gene Therapy of Parkinson's Disease. Exp Neurol. 1997;144(1):4-9.

59. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine Receptors: From Structure to Function. Physiol Rev. 1998;78(1):189-225.

60. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The Physiology, Signaling, and

- Pharmacology of Dopamine Receptors. Sibley DR, editor. *Pharmacol Rev.* 2011;63(1):182-217.
61. Jackson DM, Westlind-Danielsson A. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther.* 1994;64(2):291-370.
62. Robertson HA. Dopamine receptor interactions: some implications for the treatment of Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 1992;15(6):201-6.
63. Grotenhermen F. Los cannabinoides y el sistema endocannabinoide. *Cannabinoids.* 2006;1(1):10-4.
64. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):161-202.
65. Pascual AC. Metabolismo de los endocannabinoides en el sistema nervioso central en procesos de envejecimiento fisiológico y patológico. 2014.
66. Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM. Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience.* 1998;83(2):393-411.
67. Benito C, Núñez E, Tolón RM, Carrier EJ, Rábano A, Hillard CJ, et al. Cannabinoid CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are selectively overexpressed in neuritic plaque-associated glia in Alzheimer's disease brains. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2003;23(35):11136-41.
68. Navarro G, Morales P, Rodríguez-Cueto C, Fernández-Ruiz J, Jagerovic N, Franco R. Targeting Cannabinoid CB2 Receptors in the Central Nervous System. *Medicinal Chemistry Approaches with Focus on Neurodegenerative*

- Disorders. *Front Neurosci.* 2016;10:406.
69. Chen DJ, Gao M, Gao FF, Su QX, Wu J. Brain cannabinoid receptor 2: expression, function and modulation. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(3):312-6.
70. Prescott SM, Majerus PW. Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonoyl-monoacylglycerol intermediate. *J Biol Chem.* 1983;258(2):764-9.
71. Sugiura T, Waku K. 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids.* 2000;108(1-2):89-106.
72. Cadas H, Gaillet S, Beltramo M, Venance L, Piomelli D. Biosynthesis of an endogenous cannabinoid precursor in neurons and its control by calcium and cAMP. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 1996;16(12):3934-42.
73. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4(11):873-84.
74. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet].* 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health).
75. Datla KP, Zbarsky V, Rai D, Parkar S, Osakabe N, Aruoma OI, et al. Short-term supplementation with plant extracts rich in flavonoids protect nigrostriatal dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Am Coll Nutr.* 2007;26(4):341-9.
76. Luciani KR, Frie JA, Khokhar JY. An Open Source Automated Bar Test for Measuring Catalepsy in Rats. *eNeuro [Internet].* 2020;7(3). Disponible en:

<https://www.eneuro.org/content/7/3/ENEURO.0488-19.2020>

77. Kulikov AV, Bazovkina DV, Kondaurova EM, Popova NK. Genetic structure of hereditary catalepsy in mice. *Genes Brain Behav.* 2008;7(4):506-12.
78. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *J Vis Exp JoVE.* 2015;(96):52434.
79. Bedse G, Bluett RJ, Patrick TA, Romness NK, Gaulden AD, Kingsley PJ, et al. Therapeutic endocannabinoid augmentation for mood and anxiety disorders: comparative profiling of FAAH, MAGL and dual inhibitors. *Transl Psychiatry.* 2018;8(1):1-14.
80. El-Alfy AT, Abourashed EA, Patel C, Mazhari N, An H, Jeon A. Phenolic compounds from nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) inhibit the endocannabinoid-modulating enzyme fatty acid amide hydrolase. *J Pharm Pharmacol.* 2019;71(12):1879-89.
81. Sufian MS, Amin MR, Ali DW. Early suppression of the endocannabinoid degrading enzymes FAAH and MAGL alters locomotor development in zebrafish. *J Exp Biol.* 2021;224(16):jeb242635.
82. Sañudo-Peña MC, Romero J, Seale GE, Fernandez-Ruiz JJ, Walker JM. Activational role of cannabinoids on movement. *Eur J Pharmacol.* 2000;391(3):269-74.
83. Drews E, Schneider M, Koch M. Effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on operant behavior and locomotor activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;80(1):145-50.
84. Celorrio M, Fernández-Suárez D, Rojo-Bustamante E, Echeverry-Alzate V, Ramírez MJ, Hillard CJ, et al. Fatty acid amide hydrolase inhibition for the

symptomatic relief of Parkinson's disease. *Brain Behav Immun.* 2016;57:94-105.

85. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SPH, Marzo VD, Elphick MR, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid Receptors and Their Ligands: Beyond CB1 and CB2. *Pharmacol Rev.* 2010;62(4):588-631.

86. Rodrigues JR. Participação do sistema endocannabinoide em modelos animais de efeitos adversos motores induzidos pelo haloperidol. 2017.

87. Röpke J, Ferreira-Vieira TH, Iglesias LP, Asth L, Ribeiro FM, Moreira FA. Protective role of endocannabinoid signaling in an animal model of haloperidol-induced tardive dyskinesia. *Pharmacol Biochem Behav.* 2021;206:173193.

88. Kathuria S, Gaetani S, Fegley D, Valiño F, Duranti A, Tontini A, et al. Modulation of anxiety through blockade of anandamide hydrolysis. *Nat Med.* 2003;9(1):76-81.

89. Fernández-Ruiz J. The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *Br J Pharmacol.* 2009;156(7):1029-40.

90. Kirkedal C, Wegener G, Moreira F, Joca SRL, Liebenberg N. A dual inhibitor of FAAH and TRPV1 channels shows dose-dependent effect on depression-like behaviour in rats. *Acta Neuropsychiatr.* 2017;29(6):324-9.

91. Zanelati TV, Biojone C, Moreira FA, Guimarães FS, Joca SRL. Antidepressant-like effects of cannabidiol in mice: possible involvement of 5-HT1A receptors. *Br J Pharmacol.* 2010;159(1):122-8.

92. Linares IM, Zuardi AW, Pereira LC, Queiroz RH, Mechoulam R, Guimarães FS, et al. Cannabidiol presents an inverted U-shaped dose-response

- curve in a simulated public speaking test. *Rev Bras Psiquiatr Sao Paulo Braz* 1999. 2019;41(1):9-14.
93. Chang WH, Jaw SS, Wu HS, Tsay L, Yeh EK. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of haloperidol and reduced haloperidol in guinea pigs. *Psychopharmacology (Berl)*. 1988;96(3):285-8.
94. Xia C, Deng J, Pan Y, Lin C, Zhu Y, Xiang Z, et al. Comprehensive Profiling of Macamides and Fatty Acid Derivatives in Maca with Different Postharvest Drying Processes Using UPLC-QTOF-MS. *ACS Omega*. 2021;6(38):24484-92.
95. Nade VS, Kawale LA, Zambre SS, Kapure AB. Neuroprotective potential of *Beta vulgaris* L. in Parkinson's disease. *Indian J Pharmacol*. 2015;47(4):403-8.
96. José A y QGA. Tono y fuerza muscular. Generalidades: Evaluación neurológica del recién nacido. Ediciones Díaz de Santos; 2012. 67 p.
97. Marín M DS, Carmona V H, Ibarra Q M, Gámez C M. Enfermedad de Parkinson: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Rev Univ Ind Santander Salud*. 2018;50(1):79-92.
98. Mogavero MP, Mezzapesa DM, Savarese M, DelRosso LM, Lanza G, Ferri R. Morphological analysis of the brain subcortical gray structures in restless legs syndrome. *Sleep Med*. 2021;88:74-80.
99. Oláh T, Bodnár D, Tóth A, Vincze J, Fodor J, Reischl B, et al. Cannabinoid signalling inhibits sarcoplasmic Ca²⁺ release and regulates excitation–contraction coupling in mammalian skeletal muscle. *J Physiol*. 2016;594(24):7381-98.
100. Ge D, Odierna GL, Phillips WD. Influence of cannabinoids upon nerve-

evoked skeletal muscle contraction. *Neurosci Lett.* 2020;725:134900.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Certificados de análisis de drogas

MACOMCH-01



Product: Name: (9Z,12Z)-N-benzylheptadeca-9,12-dienamide (MACA1)(for investigational use)
Reference: MACA1
Formula: $C_{25}H_{32}NO$ **Molecular weight:** 369.58

Lot No.: RA-MAC-05 **Storage:** 5 °C under nitrogen

Manufacture date: November 2019 **Analysis No.:** N/A

Analysis date: November 2019 **Retest date:** To be determined

Version: 00

Certificate of Analysis

Test	Result
Description (Physical examination)	off-white powder
Identification A (IR)	Concordant with the structure
Identification C (H NMR)	Concordant with the structure
Purity (CG)	>99%
Residual solvents (GC)	Acetone= 33 ppm

Date: 26-November-2019



Anexo 2. Aprobación del comité de ética



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA 021-05-23

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética.

Título del Proyecto : **“Efecto de la macamida sintética MACOMCH-01 sobre los síntomas parkinsonianos del modelo de haloperidol en ratas”.**

Código de inscripción : **211070**

Investigador(a) principal(es) : **Gyr Moron, Emilia**

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

Protocolo de investigación, versión recibida en fecha 10 de junio del 2023.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada seis meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **21 de junio del 2024**. Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

El presente proyecto de investigación sólo podrá iniciarse después de haber obtenido la(s) autorización(es) de la(s) institución(es) donde se ejecutará.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 22 de junio del 2023.



Dr. Manuel Gasco Tantachuco
Presidente
Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

/sr

Av. Honorario Delgado 430
San Martín de Porres
Apartado Postal 4314
319 0000 Anexo 201355
orve.ciea@oficinas-upch.pe
cayetano.edu.pe

**Comité Institucional de Ética
para el uso de Animales**