

TÍTULO DEL PROYECTO

EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE Muehlenbeckia volcánica "MULLACA" SOBRE EL APRENDIZAJE Y MEMORIA ESPACIAL EN RATAS CON DAÑO COGNITIVO INDUCIDO POR LA ESCOPOLAMINA.

SIGLAS

NEURONA

TIPO DE PROYECTO

Basica

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

Salud mental

DURACIÓN ESTIMADA

Fecha de inicio: 16/03/2016 Fecha de término: 16/03/2017

PARTICIPANTES

- BURGOS CHAVEZ OTHONIEL ABELARDO (COLABORADOR) — 000000339
- ALTAMIRANO SARMIENTO DAN ORLANDO (COORDINADOR(INV. PRINCIPAL)) — 000146200
- HERRERA ARCE SHIRLEY ARACELLY (ESTUDIANTE) — 000136898
- LLANOS QUEVEDO JOSE (COLABORADOR) — 17877373
- FERNANDEZ RODRIGUEZ, LISSETT JEANETTE (DOCENTE) — 000002885
- ROBERTO OSMUNDO YBAÑEZ JULCA (COLABORADOR) — 18159512

INSTITUCIÓN O LUGAR A EJECUCARSE

- UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUIJILLO (FARMACOLOGIA)
- UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO - UPAO (Fisiología Humana)

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas medicinales constituyen una fuente natural de metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas de gran importancia para el control de muchas enfermedades. El Perú es un país con una diversidad de flora única en el mundo, la misma que está representada por más de 25,000 plantas, de las cuales cerca de 1,400 tienen propiedades curativas ^(1,2, 3).

La Muehlenbeckia volcánica (Benth.) End "Mullaca" es una excelente planta tintórea de donde se obtiene un intenso color azul, utilizado en el teñido de los textiles de culturas prehispánicas como Paracas e Inca. La firmeza de este tinte natural perdura hasta el día de hoy en estos textiles, lo que causa admiración en todo el mundo; también posee propiedades medicinales, conocidas desde tiempos milenarios: sus hojas y tallos son usados con buenos resultados en inflamación renal, cólico menstrual, gripes, rinofaringitis, bronquitis, afta, fiebre, tos, asma, también presenta propiedades cicatrizantes; además es antialérgica ^(4, 5, 6).

Los frutos de esta planta han sido poco estudiados, sin embargo fueron consumidos hace

muchísimo tiempo y formaron parte de la cultura dietética de tiempos pre incas. Hasta la fecha solo se conoce testimonios personales, y se dice que el consumo de este tipo de fruto mejora el recuerdo de hechos pasado y facilita el aprendizaje, así lo manifiestan los lugareños que viven en la sierra de la libertad y el centro del Perú (7, 8).

Algunos ensayos en investigación fitoquímica de la familia: Poligonáceas sugieren la presencia de triterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, saponinas y catequinas. También se le ha atribuido de una posible actividad antioxidante, sin embargo los mecanismos fisiológicos no son bien conocidos que permita determinar su actividad terapéutica (3, 6, 8).

La especie vegetal objeto de este trabajo de investigación, "Mullaca" será seleccionada a partir de un screening preliminar, considerando plantas endémicas de la región la libertad, en condiciones de extinción. Sin embargo fue seleccionada por presentar posible actividad beneficiosa para el aprendizaje y memoria (4, 5, 9).

La *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl, es una especie que crece en diversas zonas de Latinoamérica, en nuestro país poco se conoce de esta planta y sus posibles beneficios para la salud mental. El escaso conocimiento que existe acerca de sus posibles acciones neurofarmacológicas nos animó a realizar el estudio, la finalidad es poder aportar nuevos conocimientos respecto a su actividad neurofarmacológica, con la esperanza de encontrar otros principios activos con propiedades beneficiosas sobre el sistema nervioso central (4, 9).

Sus descripción botánica corresponde al reino: Plantae; División: Magnoliophyta; Clase : Magnoliopsida; Orden: Polygonales; Familia : Polygonaceae; Género: *Muehlenbeckia*; Especie: *Muehlenbeckia volcánica* (Benth) Endl (4).

Esta especie vegetal tiene pocas especies de notoriedad en el medio andino. Pertenece al estrato herbáceo que crece preferentemente en climas meso y microtermicos de las alturas andinas, por lo general en forma espontánea y en lugares rocosos. Su denominación taxonómica "volcánica" obedece al hecho de crecer, sobre todo, entre rocas eruptivas. Las especies de mayor valor terapéutico son dos. La *Muehlenbeckia volcánica*, que crece adherida a las rocas ígneas, siendo muy buscada por sus propiedades terapéuticas, al igual que la *Muehlenbeckia tamnifolia*, especie muy similar a la anterior, con pequeñas diferencias morfológicas de las hojas y de tamaño, creciendo preferentemente en los valles andinos de clima templado (4, 10, 11).

La *Muehlenbeckia volcánica* (Benth)Endl, también es conocida con los nombres de: Bejuquillo, coca coca, muyaca, mullaca, pasamullaca, sachamullaaca. Como se sabe la Mullaca popularmente conocida, es un suárbusto rastro, extendido, de flores blancas que habitan en la región de la sierra del Perú. Se encuentra a altitudes a partir de los 2800 a 4200 m.s.n.m, en los departamentos de Cajamarca, Ancash y la libertad; su valor medicinal y nutritivo es conocido y utilizado en estas regiones desde la época pre-inca. Aparece recogida en los escritos del "Museo de Antropología, Arqueología, e Historia de Perú", bajo el nombre de "Mullaca" (4, 12, 13).

II. ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

Las plantas medicinales constituyen una fuente natural de metabolitos secundarios con propiedades terapéuticas de gran importancia para el control de muchas enfermedades. El Perú es un país con una diversidad de flora única en el mundo, la misma que está representada por más de 25,000 plantas, de las cuales cerca de 1,400 tienen propiedades curativas ^(1,2, 3).

La *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl "Mullaca" es una excelente planta tintórea de donde se obtiene un intenso color azul, utilizado en el teñido de los textiles de culturas prehispánicas como Paracas e Inca. La firmeza de este tinte natural perdura hasta el día de hoy en estos textiles, lo que causa admiración en todo el mundo; también posee propiedades medicinales, conocidas desde tiempos milenarios: sus hojas y tallos son usados con buenos resultados en inflamación renal, cólico menstrual, gripes, rinofaringitis, bronquitis, afta, fiebre, tos, asma, también presenta propiedades cicatrizantes; además es antialérgica ^(4, 5, 6).

Los frutos de esta planta han sido poco estudiados, sin embargo fueron consumidos hace muchísimo tiempo y formaron parte de la cultura dietética de tiempos pre incas. Hasta la fecha solo se conoce testimonios personales, y se dice que el consumo de este tipo de fruto mejora el recuerdo de hechos pasado y facilita el aprendizaje, así lo manifiestan los lugareños que viven en la sierra de la libertad y el centro del Perú ^(7, 8).

Algunos ensayos en investigación fitoquímica de la familia: Poligonáceas sugieren la presentarían de triterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, saponinas y catequinas. También se le ha atribuido de una posible actividad antioxidante, sin embargo no se ha realizado estudios fitoquímicos completos que permita determinar exactamente su composición química ^(3, 6, 8).

La especie vegetal objeto de este trabajo de investigación, "Mullaca" fue seleccionada a partir de un screening preliminar, considerando plantas endémicas de la región la libertad, en condiciones de extinción. Sin embargo fue seleccionada por presentar posible actividad beneficiosa para el aprendizaje y memoria ^(4, 5, 9).

La *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl, es una especie que crece en diversas zonas de Latinoamérica, en nuestro país poco se conoce de esta planta y sus posibles beneficios para la salud mental. El escaso conocimiento que existe acerca de sus posibles acciones neurofarmacológicas nos animó a realizar el estudio, la finalidad es poder aportar nuevos conocimientos respecto a su actividad neurofarmacológica, con la esperanza de encontrar otros principios

activos con propiedades beneficiosas sobre el sistema nervioso central ^(4, 9).

Sus descripción botánica corresponde al reino: Plantae; División: Magnoliophyta; Clase : Magnoliopsida; Orden: Polygonales; Familia : Poligonaceae; Género: Muehlenbeckia; Especie: Muehlenbeckia volcánica (Benth) Endl ⁽⁴⁾.

Esta especie vegetal tiene pocas especies de notoriedad en el medio andino. Pertenece al estrato herbáceo que crece preferentemente en climas meso y microtermicos de las alturas andinas, por lo general en forma espontánea y en lugares rocosos. Su denominación taxonómica "volcánica" obedece al hecho de crecer, sobre todo, entre rocas eruptivas. Las especies de mayor valor terapéutico son dos. La Muehlenbeckia volcánica, que crece adherida a las rocas ígneas, siendo muy buscada por sus propiedades terapéuticas, al igual que la Muehlenbeckia tamnifolia, especie muy similar a la anterior, con pequeñas diferencias morfológicas de las hojas y de tamaño, creciendo preferentemente en los valles andinos de clima templado ^(4, 10, 11).

La Muehlenbeckia volcánica (Benth)Endl, también es conocida con los nombres de: Bejuquillo, coca coca, muyaca, mullaca, pasamullaca, sachamullaaca. Como se sabe la Mullaca popularmente conocida, es un suárbusto rastro, extendido, de flores blancas que habitan en la región de la sierra del Perú. Se encuentra a altitudes a partir de los 2800 a 4200 m.s.n.m, en los departamentos de Cajamarca, Ancash y la libertad; su valor medicinal y nutritivo es conocido y utilizado en estas regiones desde la época pre-inca. Aparece recogida en los escritos del "Museo de Antropología, Arqueología, e Historia de Perú", bajo el nombre de "Mullaca" ^(4, 12, 13).

Algunos autores afirman que la Mullaca es una planta, cuyo nombre es de origen aymara, ya que se desarrolló en zonas donde se asentaron grandes culturas como Wari, Tiahuanaco e Inca. La flor de esta especie posee un tinte de color azul oscuro que se utilizó desde épocas milenarias para teñir las fibras que se emplearon en la confección de textiles. La Mullaca también fue utilizada con fines nutritivos y medicinales. Sus hojas y tallos son usados con buenos resultados en gripes, rinofaringitis, bronquitis, afta, fiebre, tos, asma y alergias. Su fruto ha sido poco estudiado, sin embargo se sabe que es consumido por los lugareños de las zonas endémicas para mejorar la memoria, evitar las cefalgias y envejecimiento ^(4, 14, 15).

También se menciona que tiene propiedades antiinflamatorias las diferentes partes de esta especie vegetal. Los ensayos realizados usando el método de la carragenina sugieren propiedades antiinflamatoria tópica ^(16, 17).

La actividad antioxidante de los frutos de Mullaca, sugieren un efecto beneficioso al evitar la proliferación de radicales libres. Como se sabe los radicales libres se asocian a diferentes etiologías de muchas enfermedades, siendo una de las más frecuentes el envejecimiento celular asociado a pérdida de aprendizaje y memoria a corto y largo plazo ^(18, 19, 20, 21).

El estudio del efecto de nuevos compuestos de origen vegetal sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) resulta de gran interés, si se tiene en cuenta que muchos de los fármacos utilizados actualmente en la terapéutica humana son compuestos derivados de extractos de plantas. El

SNC es la unidad anatómica y funcional que permite la relación del individuo consigo mismo y con su entorno, proporcionando el control consciente e inconsciente sobre todas las actividades y funciones del organismo, su unidad funcional es la neurona (22, 23, 24).

Las enfermedades del SNC se relacionan con lesiones bioquímicas en áreas específicas del cerebro o con anomalías en las funciones de transmisión, síntesis o liberación de neurotransmisores. Estas lesiones bioquímicas tienen diferente etiología, sin embargo muchos investigadores, concuerdan que su origen es la producción de radicales libres (23, 25, 26).

Respecto a los modelos experimentales para evaluar aprendizaje y memoria en roedores, se suele utilizar el laberinto acuático de Morris, que es un modelo estandarizado y especializado para evaluar memoria espacial. Para el daño cognitivo inducido en roedores machos, se utiliza la escopolamina. La escopolamina es un antagonista de receptores muscarínicos que imita de manera aguda la enfermedad de Alzheimer (27, 28).

Muchos estudios demuestran que la escopolamina, es un buen modelo para estudiar deterioro de memorias, se ha reportado que a dosis de 2 mg / kg por vía intraperitoneal, administrada 30 minutos antes de la prueba de Morris, ocasiona deterioro cognitivo y conductual (28, 29, 30).

La enfermedad de Alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa y progresiva, resultado de una amplia degeneración de la sinapsis así como de las neuronas presentes en la corteza cerebral, hipocampo y algunas estructuras subcorticales. El deterioro de las funciones de los neurotransmisores también parece jugar un papel importante en la enfermedad, entre ellos se destaca la baja cantidad de acetilcolina en la corteza cerebral (28, 29).

La función de la acetilcolina en los procesos sinápticos hace que los receptores colinérgicos también se vean afectados, dado por el degeneramiento del sistema nervioso, en mayor medida los receptores nicotínicos (involucrados en varias funciones como el control voluntario del movimiento, la memoria y atención, el sueño y alerta, el dolor y la ansiedad) y en menor medida los receptores muscarínicos (relacionados con la memoria y el aprendizaje). En uso de la escopolamina en los modelos experimentales facilita generar una situación parecida a la enfermedad de Alzheimer (28, 29).

III. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO (IMPORTANCIA, BENEFICIARIOS, RESULTADOS ESPERADOS)

La utilización de la medicina complementaria está siendo una alternativa útil para el restablecimiento de la salud de muchos pacientes que padecen alguna enfermedad neurodegenerativa. El fruto de la *Muehlenbeckia volcánica* "Mullaca", posiblemente tenga múltiples beneficios asociados a procesos cognoscitivos, se cree que algunos de los metabolitos secundarios presentes en el fruto, mimetizan efectos antidepressivos y antioxidantes con acción a

nivel celular y mitocondrial, esto evitaría la aceleración de los procesos de neurodegeneración ocasionados por los radicales libres. Como se sabe la mitocondria, participa en diferentes señalizaciones neuronales y sería la responsable de conservar y activar la neurogénesis, no solo en el hipocampo sino también en otras áreas cerebrales (27, 28).

Se sabe que la degeneración de la memoria por escopolamina altera numerosos procesos fisiológicos y patrones conductuales semejantes a la enfermedad de Alzheimer. Se conoce que el aprendizaje y la memoria son procesos complejos que dependen de muchas estructuras sin embargo el deterioro funcional de la amígdala basolateral y el hipocampo ocasionan un deterioro los procesos de consolidación y evocación de memorias. Los mecanismos fisiopatológicos son desconocidos, sin embargo se postula que la muerte celular, estaría mediado por la reducción de la acetilcolina, y la acumulación de sustancias tales como el glutamato y radicales libres (28,29, 32).

Otra de las razones que motiva la realización del trabajo de investigación, radica en que la mullaca es una de las plantas que se encuentra en proceso de extinción y poca revaloración en la cultura alimenticia. El conocimiento de sus propiedades nutraceuticas permitirá ser incluido en las dietas alimentarias, de nuestra región o país (5).

Por todo lo mencionado la medicina complementaria sigue siendo un polo de atracción para muchos científicos en el mundo, con la esperanza de encontrar datos que permitan nuevas indicaciones terapéuticas o nuevas contraindicaciones, tal es el caso del presente estudio.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general	Resultado finales	Medio verificable
Determinar el efecto del extracto acuoso de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> "mullaca" sobre el aprendizaje y memoria espacial en ratas con daño cognitivo inducido por la escopolamina	Diferencia significativa en el aprendizaje y memoria espacial en los grupos que recibieron mullaca, respecto al grupo control.	Lista de cotejos: <ul style="list-style-type: none"> • Grupo de mullaca aprende y memoriza en menor tiempo respecto al grupo control
Objetivo Especifico		

<ul style="list-style-type: none"> • Determinar la dosis y el periodo de tiempo, al cual el extracto acuoso de mullaca tiene efecto protector frente al daño cognitivo inducido por la escopolamina 	<p>Diferencia en la concentración del malondialdehído (MDA) antes y después del tratamiento.</p>	<p>Lista de cotejos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupo de mullaca tiene menor concentración de MDA respecto al grupo control, en el mayor tiempo de exposición al tratamiento de mullaca.
<ul style="list-style-type: none"> • Comparar dosis y efectos del extracto acuoso de mullaca sobre aprendizaje y memoria espacial en ratas con daño cognitivo inducido por la escopolamina 	<p>Diferencia en el aprendizaje y memoria según dosis, tiempo de administración de la mullaca.</p>	<p>Lista de cotejos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupo de mullaca que reciben mayor dosis aprende y memoriza en menor tiempo al compararlo con el grupo control. • Comparar los efectos del extracto acuoso de mullaca, sobre la inhibición de acetilcolinesterasa y Superóxido Dismutasa (SOD), antes y después de recibir tratamiento.
	<p>Diferencia antes y después del tratamiento en sistemas inhibición de acetilcolinesterasa y SOD.</p>	<p>Lista de cotejos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Grupo de mullaca presenta mayores niveles de inhibición de acetilcolinesterasa y SOD después del tratamiento.

V. MARCO TEÓRICO

La organización de los acontecimientos pasados de todo lo aprendido “memorias” por el ser humano, se codifica y almacena en el cerebro, y de esta manera se guarda información del entorno para adaptarse mejor a situaciones futuras. Muchos investigadores afirman que el aprendizaje es un proceso por el cual se adquiere nueva información y memoria. Ambos conceptos se encuentran indiscutiblemente entrelazados y en algunos casos se hace referencia al aprendizaje como el proceso por el cual se adquiere la memoria (33, 12).

Como se sabe existen diferentes tipos de memoria, en esta investigación solo se estudiar la memoria espacial a través de un modelo estandarizado, que es el laberinto acuático de Morris, el modelo seleccionado son ratas blancas sometidas a daño cognitivo inducido por la escopolamina (34).

Los animales se orientan en el espacio para organizar sus conductas en relación con el entorno en que se encuentran en cada momento. El ambiente de bajas temperaturas se considera como un ambiente extremo, cuyo fenómeno natural determinante, es la disminución de la temperatura, produciendo diferentes cambios fisiológicos asociados a estrés. Las bajas temperaturas ocasionan la activación de sistemas reguladores individuales “Termorregulación” que se asocia a la biogénesis mitocondrial. También se sabe que esta exposición genera alteraciones en diferentes funciones cognitivas (memoria, capacidad de cálculo, juicio y otros) tanto en humanos como en animales (35, 36).

El aprendizaje y la memoria espacial se relacionan con la capacidad de adquirir y retener asociaciones de las características del ambiente, lo que permite al organismo desenvolverse en el espacio. La memoria espacial consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales. Esta memoria puede ser evaluada mediante modelos animales en los que la solución de la tarea depende de la información espacial disponible (31, 33, 37).

Las investigaciones reportan que los roedores pueden adoptar cuatro formas principales de navegación para la resolución de tareas espaciales: orientación, guía, cartográfica y de integración de la ruta. En el aprendizaje de orientación los animales basan su búsqueda en movimientos aprendidos durante la ejecución de la tarea; en el aprendizaje de guía aprenden asociaciones entre los estímulos señal y la meta. Estas dos formas de navegación se explicarían mediante paradigmas asociativos de condicionamiento. En el aprendizaje cartográfico, sin embargo, implica el uso de señales distales con las que los animales se forman una representación de su entorno (mapa cognitivo), esto permite la localizan de la meta. La integración de la ruta consiste en un proceso de actualización de la información cuando las pistas ambientales no ofrecen la suficiente información, mediante un sistema interno de referencia basado en el lugar de salida antes de iniciar la navegación, para lo que el animal podría utilizar principalmente pistas cinestésicas y señales vestibulares. Estas estrategias de navegación espacial parecen depender de distintos sistemas de memoria (33, 37, 38).

En el estudio de la memoria espacial en roedores se han diseñado diferentes modelos experimentales, sin embargo el laberinto de agua (Morris) es uno de los modelos más empleados, donde las ratas tienden a aproximarse a la plataforma sumergida desde una dirección conocida, utilizando indicadores visuales específicos para reconocer su localización. Se sabe que las funciones cerebrales implicadas para ejecutar esta tarea dependen básicamente del hipocampo (31, 37, 39).

El laberinto acuático ha generado mucho interés en el campo de la psiconeurofarmacología, puesto que no necesita de la privación de agua o comida ni de la aplicación de una descarga eléctrica para motivar la conducta. Además, se requieren relativamente pocos ensayos, ya que los animales aprenden rápido, guiándose por claves espaciales, y se pueden valorar los efectos de los fármacos sobre los procesos de aprendizaje y memoria de forma más efectiva que en otros laberintos de adquisición más lenta, como el laberinto radial, en el que resulta más difícil distinguir entre los efectos agudos y crónicos (37, 38).

En la búsqueda de tratar de explicar cómo algunos nutraceuticos como aumentaban la memoria se investigó la relación entre memoria y el sistema serotoninérgico, esto permitió demostrar que ambos guardan una estrecha relación. Así se demostró que la depleción aguda de triptofano reducía la consolidación de la memoria. También se encontró que la administración aguda o crónica con inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, aumentaba los niveles de serotonina, ocasionando efectos negativos, neutros o positivos, sobre la consolidación de la memoria. Por ello se ha propuesto que la relación entre la función de la memoria y la serotonina debe ser mediada por mecanismos alternativos como los implicados en la activación de diferentes receptores, más que simplemente por la disponibilidad sináptica de serotonina (37, 40).

Este conocimiento posiblemente permitida explicar la acción terapéutica de muchos nutraceuticos, como por ejemplo el extracto de mullaca, que han sido utilizados ancestralmente para mejorar diferentes trastornos cognitivos. Hoy en día algunos neurocientíficos han cambiado sus horizontes de investigación, en medicamentos o extractos naturales, con la finalidad de contribuir al conocimiento de la medicina complementaria (41, 42, 43, 44).

VI. HIPÓTESIS

- **Hipótesis nula:** El extracto acuoso de mullaca no mejora las funciones cognitivas de aprendizaje, memoria espacial y estado de ánimo de ratas sometidas a daño cognitivo inducido por la escopolamina.
- **Hipótesis alterna:** El extracto acuoso de mullaca mejora las funciones cognitivas de aprendizaje, memoria espacial y estado de ánimo de ratas, sometidas a daño cognitivo inducido por la escopolamina, por la presencia de Inhibidores de la acetilcolinesterasa, flavonoides y atocianinas.

VII. METODOLOGÍA

Material de Estudio:

El presente estudio de investigación tendrá como material de estudio a *Rattus norvegicus var. albinus* (ratas blancas) aparentemente sanos, machos de 8 semanas de edad, con peso corporal de 250g a 280g, procedentes del Instituto Nacional de Salud (Chorrillo-Lima). Los especímenes serán trasladados al Bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, para aclimatación y análisis respectivos.

El periodo de aclimatación será al menos de catorce días, en el cual los especímenes serán sometidos a similares condiciones ambientales y de alimentación. Todos los animales se estabularan en jaulas, con ciclo natural de luz/oscuridad.

Material Fitoquímico:

Se utilizará *Muehlenbeckia volcánica* (Mullaca) en grado de pureza. Será adquirido de laboratorios de Universidad Cayetano Heredia-Lima.

DEFINICIÓN DE LA POBLACIÓN MUESTRAL.

La población a investigar estará conformada por *Rattus norvegicus var. albinus*.

DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL:

Para hallar el tamaño de muestra se hizo el uso de las siguientes fórmulas:

$$n = \frac{(Z_{/2} + Z)^2 \cdot \sigma^2}{E^2}$$

Donde:

$Z_{/2} = 1.96$, coeficiente de confiabilidad para $\alpha = 0.05$

$Z = 0.84$, coeficiente de confiabilidad para $\alpha = 0.20$

$\sigma^2 = 1.5 E$, valor asumido por no haber estudios previos.

n = tamaño muestral.

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 \cdot 2 \cdot (1.5 E)^2}{E^2} = 36$$

Con estos valores se determinó una muestra de 36 *Rattus norvegicus var. albinus*.

MÉTODOS Y TÉCNICAS:

Se utilizará el método del laberinto acuático de Morris, modificado por Roozendaal y McGaughn en 1998. El cual Consiste en una piscina circular llena de agua en la que se sitúa una plataforma que debe ser localizada por el animal de experimentación (rata), por accidente la primera vez y en sesiones posteriores debería localizarlo con ayuda de indicadores visuales (claves espaciales externas). Las funciones cerebrales implicadas para ejecutar esta tarea dependen básicamente de la actividad del hipocampo ⁽³⁷⁾.

DISEÑO EXPERIMENTAL:

Los especímenes se distribuirán en un grupo control y dos grupos problemas, con controles previos y sucesivos. Los grupos problemas recibirán tratamiento con extracto acuoso de mullaca durante dos meses y luego serán expuestos a daño cognitivo inducido por la escopolamina, el grupo control será mantenido en las mismas condiciones pero sin exposición al extracto acuoso.

Para el daño cognitivo con escopolamina se usará la dosis de 2 mg / kg por vía intraperitoneal, administrada 30 minutos antes de la prueba de Morris.

Distribución de las muestras

Los especímenes de experimentación distribuirán aleatoriamente de la siguiente manera:

Grupo I: Control, Estará conformado por 12 *Rattus norvegicus var albinus*, expuesto a daño cognitivo inducido por la escopolamina.

Grupo II: Patrón 1, Estará conformado por 12 *Rattus norvegicus var albinus*, con tratamiento de extracto acuoso de mullaca (concentraciones de 1,2 mg/g v.o, al día durante 60 días) expuestas a daño cognitivo inducido por la escopolamina

Grupo III: Problema 2, Estará conformado por 12 *Rattus norvegicus var albinus*, con tratamiento de extracto acuoso de mullaca (concentraciones de 2,4 mg/g v.o, al día durante 60 días) expuesto a daño cognitivo inducido por la escopolamina.

Descripción de variables

a) Independientes:

- Condición de daño cognitivo inducido por la escopolamina.
- Tratamiento crónico de extracto acuoso de mullaca (grupo problema).

b) Dependientes:

- Conducta exploratoria, aprendizaje y memoria espacial
- Concentración de MDA e Inhibición de acetilcolinesterasa después de recibir el tratamiento.

Laberinto acuático de Morris (37).

Para medir la capacidad del individuo para modificar su comportamiento, a partir de la experiencia con estímulos espaciales se usó el laberinto de Morris el cual consiste de una piscina circular con 180 cm de diámetro y paredes con 37 cm. de altura pintada de negro y dividida en cuatro cuadrantes imaginarios, ésta se llenó con agua (20 ± 3 °C), hasta una altura de 25 cm. y en su interior fue sumergida una plataforma de escape cilíndrica de color negro con 12.5 cm. de diámetro y 22 cm. de altura (invisible para la rata) y esta tuvo una ubicación fija en uno de los cuadrantes durante todo el experimento.

La tarea consistió en que la rata debía nadar en el laberinto hasta localizar la plataforma, las primeras veces por accidente; sin embargo, en las sesiones posteriores debía reconocer su sitio de ubicación para poder localizarla, en este caso; con la ayuda de indicadores visuales, a manera de claves espaciales externas.

Los experimentos están basados en dos tipos de ensayos; uno de entrenamiento que evalúa el aprendizaje y otro de prueba que evalúa la memoria. Para el análisis de la información se utilizará un software validado y estandarizado para este tipo de trabajos de investigación (SMART V3.0 y SMARTWM).

El ensayo de entrenamiento (Aprendizaje) de *Rattus norvegicus var. albinus* en el laberinto acuático de Morris.

Se colocará el animal de experimentación en el agua desde uno de los cuatro sitios de partida de la periferia (uno por cada cuadrante) y se esperará hasta un máximo de 60 s para que encuentre la plataforma.

El tiempo desde que la rata fue depositada en el agua hasta que localizará la plataforma será considerado como latencia de escape y su latencia máxima será de 60 s, si una vez completado este tiempo no localiza la plataforma oculta se le guiará hasta ella y allí se le dejará permanecer durante 20 s.

Enseguida la rata será retirada, secada y se le dejará permanecer en la caja con los otros animales durante 30 s, mientras empieza el siguiente ensayo, y así sucesivamente; hasta completar 12 ensayos consecutivos para cada rata ese mismo día, distribuyendo de manera balanceada los sitios de partida entre los cuatro cuadrantes

El ensayo de prueba (Memoria) de *Rattus norvegicus* var. *albinus* en el laberinto acuático de Morris.

Para el ensayo de prueba será retirada la plataforma y se introducirá a cada animal de experimentación una vez en la piscina, en un cuadrante lateral (ni el de la plataforma, ni el opuesto). Se le permitirá nadar durante 60 s. y luego será retirado del laberinto. Será registrado el tiempo que la rata permaneció navegando en el cuadrante donde estuvo.

La prueba se llevará a cabo 24 h después del último ensayo de entrenamiento, entre las 7:00-10:00 am., será video filmada y posteriormente calificada.

Determinación de la lipoperoxidación en suero de *Rattus norvegicus* var. *Albinus* (45).

Se usará el kit para ensayo de lipid peroxidation (MDA), usa el método colorimétrico de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el cual se basa en la reacción del malondialdehído (MDA) con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables que se cuantifica por espectrofotometría de absorción a 532 nm. En tubos de ensayo de 10 mL de capacidad, se añaden respectivamente 100 L de suero (muestras problema o control), 100 L de H₂O destilada, a continuación se agregaron los siguientes reactivos en el orden que se describe.

v 0,1 mL de reactivo butil-hidroxi-tolueno (BHT) en etanol.

v 0,1 mL de reactivo catalizador (tricloruro de hierro (III) FeCl₃.6H₂O, en agua destilada).

v 1,5 mL de disolución tampón (HCl-glicocola).

Esta mezcla de reacción se mantiene 60 minutos a 5° C.

Transcurrido este tiempo, se lleva a ebullición en un baño de agua a una temperatura entre 95° C y 100° C durante 60 minutos, para desarrollar la máxima coloración en todas las muestras y patrones.

Trascurrido el tiempo se procede a la extracción de los aductos con una disolución mezcla de 2,5 mL de una disolución de n-butanol-piridina (15:1 V/V) y 0,5 mL de agua destilada, enfriando previamente los tubos en un baño de hielo.

Se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 10 minutos, las capas superiores o sobrenadantes se recogen en un tubo limpio

Se procederá a la lectura de las absorbancias a 532 nm, luego de la lectura de un blanco.

Determinación de la inhibición de la actividad colinesterásica.

Se usará el kit para determinación de la capacidad de inhibición de la actividad colinesterásica, el cual basa en un método espectrofotométrico. La colinesterasa cataliza la hidrólisis del sustrato butiriltiocolina formando butirato y tiocolina. Esta última reduce el ácido 5,5'-mercaptobis-2-nitrobenzoico (DMNB) a 5-mercapto-2-nitrobenzoate (5-MNBA), un compuesto coloreado. La reacción se controla cinéticamente a 405 nm a partir de la velocidad de formación del color amarillo producido, proporcional a la actividad colinesterasa en la muestra.

Ensayo de Superóxido Dismutasa (SOD) .

Se usara el kit para determinación la SOD, donde los aniones superóxido, generados por la conversión de la xantina a ácido úrico y peróxido de hidrógeno debido a la actividad de la xantina oxidasa (XOD), reducen el WST-1 (4-(2,4,6-tris(4-iodophenyl)-1,3,5-triazin-2-yl)benzene disulfonate sodium salt) a cristales de formazán solubles en agua, los cuales pueden medirse mediante absorbancia a 438 nm.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

Para determinar si hay diferencia entre la conducta exploratoria, aprendizaje y memoria espacial en las diferentes etapas de la investigación se harán un análisis de varianza (ANOVA).

Para comparar las diferentes etapas de investigación se empleará la Prueba de Comparaciones Múltiples utilizando la diferencia mínima significativa o prueba de Duncan con un valor de significancia del 5 %.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Justo Mantilla H, Oscar Olazabal C. Plantas Medicinales de nuestra Madre Tierra Valle Sagrado de los Inkas – Cusco. Instituto de Ecología y Plantas Medicinales “Pachamama Hampi Qhoranchiskuna”. Perú 2008. pp 80-82.
2. Mejía K. & E. Rengifo. Plantas Medicinales en el uso popular de la Amazonia Peruana. Lima, Agencia Española de Cooperación Internacional. 2000. Pp 286.
3. Castillo R. Patricia, Bendezu A, Rocio, Franco S., Esther. Actividad Antioxidante de la especie *Muehlenbeckia volcánica* (Benth) End (mullaca). Dirección General de Investigación UNICA. 2009. Pp. 54 – 63.
4. J., Mostacero F. Mejía O. Gamarra T. Fanerógamas del Perú. Edit. CONCYTEC. GRAFICART SRL. Trujillo-Perú. 2009. Pp 445-445
5. Mejía K. & E. Rengifo. Plantas Medicinales en el uso popular de la Amazonia Peruana. Lima, Agencia Española de Cooperación Internacional. 2000. Pp. 286.
6. Isau H. and Et al. Richness, use and origin of expended medicinal plants in the markets of the Cusco City. *Rev. Perú. biol.* 2011. 18(3): 283 – 291.
7. Brako, L. & J. Zarucchi. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. *Monographs in Systematic Botany of the Missouri Botanical Garden.* 1993. 45: 414-425
8. Bussmann R, W & Sharon, D. Traditional medicinal plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. *Journal of Ethnobiology and thnomedicine.* 2006. Pp. 72 – 84.
9. Bastianetto, S., Quirion, R. Natural extracts as possible agents of brain aging *Neurobiol Aging.* 2002, 1(23), 891-897.
10. Bussmann W, Sharon, I. Vandebroek., A. Jones & Z. Revene. Health for sale: the medicinal plant markets in Trujillo and Chiclayo, Northern Peru. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* 2007. Pp. 36 – 55.
11. Macía J.M., E. García & P. J. Vidaurre. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *Journal of Ethnopharmacology.* 2004. pp 337–350.
12. Ducke, D & R. Vásquez. *Amazonian Ethnobotanical Dictionary.* CRC Press. USA. 1994. Pp 215.
13. Moscoso, C. M. *Secretos medicinales de la flora peruana y Guía de la Maternidad.* Edit. Bartolomé de las Casas. Cusco – Perú. 2001. pp 230.
14. Aldave P., A. y J., Mostacero L. *Botánica Farmacéutica.* Edit. Libertad, EIRL. Trujillo-Perú. 1998. pp 08-13
15. Vinson, A, Hao, Su, X, Zubik, S. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J Agric Food Chem.* 1998 1(46), 330-334.
16. Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W. Carrageenan-induced edema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity. *Proc Soc Exp Biol Ther.* 1992 1(11), 544-547.
17. La Torre-Cuadros, M. A & J. Albán. *Etnobotánica de los Andes del Perú.* En: Ed. M. Moraes et

- al. *Botánica Económica de los andes Centrales*. La Paz – Bolivia. 2006. pp 239 – 245.
18. Pandey, K.B., Rizvi, I. Plant Polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2009 1(2), 270-278.
 19. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med*. 1991; 91, 14.
 20. Brack, A. *Diccionario enciclopédico de plantas útiles del Perú*. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, Centro Bartolomé de las Casas, Cuzco. 1999. pp. 550.
 21. Vidaurre, R. P. *Plantas Medicinales de los Andes de Bolivia*. En: Ed. M. Moraes et al. *Botánica Económica de los andes Centrales*. La Paz – Bolivia. 2006. pp 268 – 284.
 22. Ramos E, Castaneda B, Ibáñez L. Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas. *Rev Acad Peru Salud*. 2008; 15 (1): 4246.
 23. Turner, A.R. *Screening methods in pharmacology*. Ed. Academic Press. 1995. Pp 86-99.
 24. Irwin, S. *Drug screening and evaluate procedures Science* 1992. pp 123-26.
 25. Bastianetto, S., Quirion, R. Natural extracts as possible agents of brain aging *Neurobiol Aging*. 2002 1(23), 891-897.
 26. Béjar, E., Reyes-Chilpa, R., Jiménez-Estrada, M. Bioactive compounds from selected plants used in the XVI century Mexican traditional medicine. *Stud Nat Prod Chem*. 2000 1(24), 799-844.
 27. Michael S, Barbara H, Aharon L, Harris L. Spatial memory under acute cold and restraint stress. *Physiology & Behavior*. %5BInternet%5D. 1998 %5Bcitado 18 Mayo 2015%5D; 64(5):605%u2010619. Disponible en:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003193849800912>
 28. Hosseini M, and Et al. Effects of the hydro-alcoholic extract of *Nigella sativa* on scopolamine-induced spatial memory impairment in rats and its possible mechanism. *Chin J Integr Med*. 2015. 21(6):438-440
 29. Sareh K, Seyed H, Vajihah A. and Et al. The effects of tamoxifen on spatial and nonspatial learning and memory impairments induced by scopolamine and the brain tissues oxidative damage in ovariectomized rats. *Adv Biomed Res*. 2015.12(4): 196 -202.
 30. Dorr, M., D. Jayce, R.D., Porsolt, H., Steinberg, A., Summerfield, N., Tomkiewicz, S. Persistence of dose related behavior in mice. *Nature*. 1991. 2(21), 121- 123.
 31. Dunham, M.W., Miya, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Pharm Assoc*, 1997. 1(46) 208-209.
 32. Gonn J, Gonn R. The pharmacology of neural rescue with cerebral hypothermia. *Early human development*. 1998; 1(53) 19-35
 33. Dhikau V, Anand KS. Is hippocampal atrophy a future drug target? *Med Hypotheses* 2007; 68(6):1300-6.
 34. Solís, H. y Arauz, C.J. Modelos experimentales en epilepsia. En: *Epilepsia, Un enfoque multidisciplinario*. (Feria, A., Martínez de Muñoz, D. y Rubio, F., eds.). Editorial Trillas, 1998. pp. 74-97.
 35. Beatty, W.W. and Shavalia, D.A. Spatial memory in rats. Time course of working memory and effects of anesthetics. *Behav. Neural Biol*. 1990. 1(28) 454-462.

36. Sheline I, Mintun M. Structural and functional Imaging of Affective Disorders. In: Davis K, Charney D, Coyle J, Nemeroff C. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2002, pp. 1065-1080.
37. Morris, R.G.M. Development of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 1984; 11, 47-60.
38. Quirk, G. J., R. U. Muller, and J. L. Kubie. The firing of hippocampal place cells in the dark reflects the rat's recent experience. *J. Neurosci.* 1990. 1(10) 2008-2017.
39. Pavlov. I.P. The scientific investigation of the physical faculties or processes in the higher animals. *Science.* 1906. 1(24) 613-19.
40. Fukumoto L, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48 (8): 3597-3604.
41. Pineda, A.G., Gutiérrez, V.M., Flores, A.M. y Pacheco, M.F. Análisis farmacológico conductual de la DL-4-hidroxi, 4-etil, 4-fenil butiramida (HEPB) sobre los componentes motor y discriminativo de la memoria de reconocimiento en la rata. *Arch Neurocién (Mex).* 1996. 1(3):186-188.
42. Mustafa, R.A., Hamid, A.A., Mohamed, S., Bakar, F.A. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *Food Chem.* 2010. 2(75), 28-35.
43. Rice-Evans, C. Plant polyphenols: Free radical scavengers or chain-breaking antioxidants. *Biochem Soc Sys.* 1995 3(61). 103-116.
44. Ammassari-Teule, M. y Passino, E. The dorsal hippocampus is selectively involved in the processing of spatial information even in mice with a genetic hippocampal dysfunction. *Psychobiology.* 1997. 2(25). 118-125.
45. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technol.* 1995; 28 (1): 25-30.
46. Siney P. Colowick and Nathan O. Kaplan.: *Methods in Enzymology, Volumen I* Ed. AP-New York, 2000. Pp: 3-7.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDAD	INICIO	FIN
Informe Parcial del Proyecto	16/03/2016	07/09/2016
Reporte: Datos preliminares de experimentación	08/06/2016	31/08/2016
Informe Final del Proyecto	08/09/2016	16/03/2017

PRESUPUESTO

DESCRIPCION	CANTIDAD	PRECIO_UNITARIO	PRECIO_PARCIAL
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	400	400
Librerías, Programas, Licencias, Plantillas de Diseño, etc.	1 UNI	13311.65	13311.65
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	160	160
REACTIVOS E INSUMOS	30 UNI	8	240
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	2000	2000
REACTIVOS E INSUMOS	40 UNI	20	800
REACTIVOS E INSUMOS	2 UNI	200	400
REACTIVOS E INSUMOS	20 UNI	10	200
REACTIVOS E INSUMOS	60 UNI	4	240
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	1400	1400
REACTIVOS E INSUMOS	1 UNI	800	800
			Total 19951.65