



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Estudios Neurofarmacológicos de *N*-bencilpiperazina y su
Metabolito *N*-benciletilendiamina en *Danio rerio***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

DIEGO HUESCA ESTRADA



CDMX

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: **Andrés Navarrete Castro**

Vocal: **María Eva González Trujano**

Secretario: **Itzel Susana De La Rosa Lara**

Primer suplente: **Ariana Elizabeth Vargas Castillo**

Segundo suplente: **José Luis Balderas López**

Sitio donde se desarrolló el trabajo presente:

Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Conjunto E
Edificio de Bioquímica y Farmacia, Departamento de Farmacia, Laboratorio 126.

Asesor: **Dr. Andrés Navarrete Castro**

Sustentante: **Diego Huesca Estrada**

Índice temático

1. Resumen.....	16
2. Marco Teórico	17
2.1. <i>Danio rerio</i>	17
2.2. Ansiedad.....	18
2.3. Sistema de recompensa.....	19
2.4. Toxicidad	20
2.5. Memoria	20
2.6. <i>N</i> -bencilpiperazina y <i>N</i> -benciletilendiamina.....	21
2.7. Serotonina	24
2.8. Dopamina	26
2.9. Perfil de actividad biológica.....	27
3. Justificación.....	28
4. Hipótesis	28
5. Objetivos.....	29
5.1. Objetivo general.....	29
5.2. Objetivos específicos.....	29
6. Materiales y métodos.....	30
6.1. Animales	30
6.2. Fármacos y reactivos.....	30
6.3. Diseño experimental.....	30
6.3.1. Administración de los fármacos.....	30
6.3.2. Evaluación de la ansiedad	31
6.3.3. Evaluación del efecto sobre la recompensa.....	32
6.3.4. Evaluación sobre la Consolidación de la Memoria.....	32
6.3.5. Determinación de la toxicidad aguda.....	33
6.3.6. Obtención del Perfil de Actividad biológica.....	33

6.4.	Metodología	35
6.4.1.	Prueba de claro-oscuro.....	35
6.4.2.	Prueba de cambio de sitio de preferencia condicionado (CSPC).....	36
6.4.3.	Prueba de evitación pasiva.....	38
6.4.4.	Determinación del parámetro de la DL ₅₀	39
6.4.5.	Obtención del perfil de actividad biológica.....	40
7.	Resultados	41
7.1.	Evaluación de la ansiedad.....	41
7.2.	Evaluación del efecto sobre la recompensa.....	51
7.3.	Evaluación sobre la consolidación de la memoria.....	53
7.4.	Determinación de la toxicidad aguda	56
7.5.	Obtención del perfil de actividad biológica.....	57
8.	Discusión	59
9.	Conclusiones	63
10.	Referencias	64

Índice de Figuras

1.	Ejemplares de <i>Danio rerio</i>	17
2.	Ruta metabólica propuesta para el metabolismo de BZP a BEDA	21
3.	Aparato empleado en la evaluación de la ansiedad	35
4.	Aparato empleado en la determinación del efecto sobre la recompensa.....	36
5.	Línea temporal de la evaluación del efecto sobre la recompensa.....	37
6.	Aparato empleado en la evaluación de la consolidación de la memoria.....	38
7A.	Número de entradas al espacio claro en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.	41
7B.	Scototaxia en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.	42
7C.	Latencia de entrada al espacio claro en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.	42
7D.	Tiempo de congelamiento en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.....	43
7E.	Número de nados erráticos en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.	44
7F.	Proporción del número de entradas de evaluación del riesgo respecto al número de entradas al espacio claro en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico	44
7G.	Proporción de tigmotaxia respecto al tiempo en espacio claro en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.....	45
8A.	Número de entradas al espacio claro en la evaluación del efecto ansiogénico/ansiolítico BZP y BEDA.....	46
8B.	Scototaxia en la evaluación del efecto ansiogénico/ansiolítico BZP y BEDA	46
8C.	Latencia de entrada al espacio claro en la evaluación del efecto ansiogénico/ansiolítico BZP y BEDA.....	47

8D.	Tiempo de congelamiento en la evaluación del efecto ansiogénico/ansiolítico BZP y BEDA	48
8E.	Número de nados erráticos en la evaluación del efecto ansiogénico/ansiolítico BZP y BEDA	48
8F.	Proporción del número de entradas de evaluación del riesgo respecto al número de entradas al espacio claro en la evaluación del efecto ansiogénico/ansiolítico BZP y BEDA	49
8G.	Proporción de tigmotaxia respecto al tiempo en espacio claro en la evaluación del efecto ansiogénico/ansiolítico BZP y BEDA.....	50
9A.	Porcentaje de Cambio en el Sitio de Preferencia Condicionado por BZP.....	51
9B.	Porcentaje de Cambio en el Sitio de Preferencia Condicionado por BEDA	51
10A.	Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para SSI	53
10B.	Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para escopolamina 0.1 mg/kg	54
10C.	Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para piracetam 10 mg/kg.....	54
11.	Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para BZP 1 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg.	55
12.	Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para BEDA 1 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg	55

Índice de Tablas

1.	Familias de receptores de <i>5-HT</i>	25
2.	Subtipos de familias de receptores de <i>5-HT</i>	25
3.	Receptores de Dopamina.....	26
4.	Definición de parámetros conductuales y descripción de los etogramas característicos del efecto ansiogénico y efecto ansiolítico.....	31
5.	Algoritmo propuesto por Lorke para la estimación de DL_{50}	40
6.	Resultados de la estimación de la DL_{50} para BZP y BEDA.....	56
7.	Perfil de Actividad Biológica para BZP con un filtro de $Pa > 0.7$	57
8.	Perfil de Actividad Biológica para BEDA con un filtro de $Pa > 0.7$	58

Lista de abreviaturas

BZP: *N*-bencilpiperazina

BEDA: *N*-benciletilendiamina

DA: Dopamina

DAT: Transportador de dopamina

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

5-HT: 5-hidroxitriptamina

NADPH: Nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

O₂: Oxígeno

Cit P450: Citocromo P450

SNC: Sistema nervioso central

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

CSPC: Cambio de sitio de preferencia condicionado

EtOH: Etanol

SSI: Solución salina isotónica

CAF: Cafeína

DZ: Diazepam

Tx: Tratamiento

E1: Entrenamiento 1

E2: Entrenamiento 2

E3: Entrenamiento 3

ANOVA: Análisis de varianza

EEM: Error estándar de la media

Resumen

La búsqueda de nuevas metodologías para la evaluación neurofarmacológica en investigación va en aumento, considerando siempre un refinamiento de las técnicas, innovación de métodos y reducción de costos.

Para lo anterior Danio rerio o coloquialmente conocido como pez cebra ha demostrado ser un organismo novedoso para la neurofarmacología debido a la semejanza fenotípica y genotípica respecto al humano en cuestión de sistema nervioso central (SNC) así como la robustez de fenotipos conductuales.

En el presente trabajo se establecen métodos experimentales para evaluar la neurofarmacología de sustancias con efecto sobre SNC, empleando a *N*-benzilpiperazina y *N*-benciletilendiamina como fármacos de referencia y al pez cebra como modelo experimental.

Como estrategia experimental las metodologías consistieron en la evaluación de la ansiedad con la prueba de claro/oscuro usando cafeína y diazepam como grupos testigo para el efecto ansiogénico y ansiolítico respectivamente, efecto sobre la recompensa usando la prueba del cambio de sitio de preferencia condicionado (CSPC), efecto sobre la consolidación de la memoria con la prueba de evitación pasiva empleando piracetam y escopolamina como grupos testigo del incremento en la consolidación y efecto amnésico respectivamente, además se realizó la estimación de la DL_{50} usando el método de Lorke y la obtención de un perfil de actividad biológica asociado a la molécula por métodos bioinformáticos.

BZP y BEDA fueron administrados vía intraperitoneal a una razón de 10 μ L/g de peso del pez y fueron evaluados a las dosis de 1 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg en el caso de evaluación de la ansiedad, efecto sobre la recompensa y efecto sobre la consolidación de la memoria.

Los resultados obtenidos permitieron establecer las metodologías antes mencionadas y sugieren además actividad ansiogénica para BZP y BEDA, además de efecto sobre la recompensa y efecto sobre la consolidación de la memoria únicamente para BZP.

2. Marco Teórico

2.1. *Danio rerio*

El pez cebra, o del inglés zebra fish, cuyo nombre científico es *Danio rerio* (Figura 1), es un animal que ha cobrado auge como modelo experimental para diversas disciplinas del gremio científico. Lo anterior, debido a las similitudes que posee respecto al humano, tanto en cuestiones anatómicas, fisiológicas, genéticas y genómicas. Se ha descrito que *D. rerio* es un organismo con un genoma rico en secuencias ortólogas respecto al humano, siendo que comparten hasta el 70% de su genoma, lo cual hace de este animal un buen modelo en investigación básica y preclínica para la búsqueda de nuevos fármacos. (1)

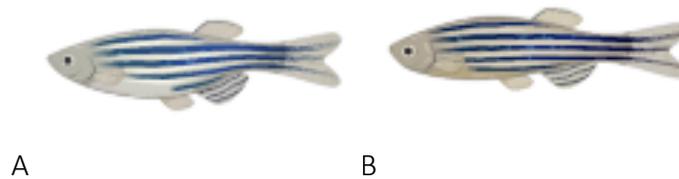


Figura 1. Ejemplares de *Danio rerio* (A) Hembra (B) Macho

Desde el punto de vista de Sistema Nervioso Central (SNC), este pez tiene grandes similitudes respecto al humano, que a continuación se describen.

En cuestión anatómica del cerebro, comparte similitud respecto al humano debido a que su cerebro esta conformado por diencéfalo, telencéfalo y cerebelo; además posee un sistema nervioso periférico bien definido con componentes autónomos, motores y sensoriales, así como un sistema nervioso entérico; de igual forma tiene órganos sensoriales especializados como ojo, sistema olfativo y auditivo. Respecto a comportamiento exhiben conductas bien definidas y una función neural integrada como memoria, respuestas condicionadas y comportamientos sociales como el aprendizaje. (2)

El uso de pez cebra en la investigación básica y preclínica en neurociencias va en aumento, las razones de esto, además de las genéticas y anatómicas antes mencionadas, es que el mantenimiento de los peces resulta económico frente a modelos murinos, además el uso de este animal se ajusta a las 3R's de los principios de ética en investigación (*Reemplazar, Refinar y Reducir*) comparado con otros modelos animales, además, el pez tiene un tiempo de desarrollo y crecimiento considerablemente acelerado. Finalmente, se ha descrito que los modelos experimentales en *D. rerio* usados en neurociencias tienen fenotipos robustos ya que se han mantenido altamente conservadas las vías involucradas en procesos neurológicos principalmente las vías de la dopamina y serotonina lo que hace del pez cebra un modelo adecuado en la investigación neuroconductual de moléculas que involucren estas vías en su acción biológica. (3)(4)(5)

Debido a las razones mencionadas con anterioridad, resulta interesante establecer metodologías en el grupo de investigación que permitan el uso del pez cebra en la evaluación de la ansiedad, efecto sobre la recompensa y memoria ya que *Danio rerio* es considerado un modelo adecuado para la evaluación de sustancias con actividad en el SNC.(3)

2.2. Ansiedad

La ansiedad es un estado de la función cerebral como consecuencia de la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, y que además es asociado al concepto de aprehensión, estado de alerta, miedo e inseguridad. Los signos clásicos de la aparición de la ansiedad, o bien de un efecto ansiogénico son insomnio, taquicardia, taquipnea, tensión muscular, tremor y desórdenes de carácter conductual y emocional como el pánico. (6)(7)

Algunas de las moléculas que generan ansiedad son catalogados dentro del grupo terapéuticos de los antidepresivos, dentro de este grupo se encuentran los antidepresivos tricíclicos, los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) y los inhibidores de

la monoamino oxidasa (iMAO). También existe el grupo denominado estimulantes del sistema nervioso central. Este grupo se clasifica en estimulantes mayores y menores, dentro de la primera clasificación se encuentran sustancias de abuso como la cocaína y las anfetaminas y sus derivados, mientras que en la segunda clasificación se incluyen a las metilxantinas como la cafeína a la cual se le ha atribuido un efecto ansiogénico.(8) (9)

Por otro lado, de forma contraria a la ansiedad se encuentra un estado propiciado por depresión del SNC teniendo como resultado la relajación muscular, disminución de la frecuencia cardíaca y respiratoria. Las moléculas que generán dicho estado son denominadas como sustancias ansiolíticas y dentro este grupo se encuentran las benzodiazepinas cuyo representante más significativo es el diazepam.(9)

2.3. Sistema de Recompensa

El sistema de recompensa es un conjunto de mecanismos fisiológicos realizados por el cerebro que permiten asociar un evento con una sensación de bienestar o placer, de forma tal que la conducta de un individuo puede ser modificada con el fin de repetir la experiencia que lo ocasiono. De acuerdo a lo anterior, el sistema de recompensa es uno de los eventos adversos asociados al uso de fármacos con actividad sobre el SNC. Se ha descrito que la recompensa es un efecto que puede deberse a diferentes alteraciones del funcionamiento del organismo como anormalidades en la regulación endocrina, tolerancia al efecto tras administraciones repetidas, disfunciones en la sinapsis neuronal, sensibilidad o condiciones genéticas.(10)(11)

Hoy en día, el pez cebra es uno de los modelos que ha cobrado auge para la evaluación de la respuesta de recompensa, esto debido a que en este organismo se ha conservado el fenotipo dopaminérgico del sistema mesolímbico en SNC, y se ha demostrado que esta vía esta involucrada en la recompensa de mamíferos.(5)

El mecanismo involucrado para que una sustancia produzca recompensa tiene su origen en el sistema mesolímbico mediante una alteración de la vía dopaminérgica al presentarse un bloqueo de los transportadores de dopamina (DAT). Lo anterior ocasiona un aumento en el espacio sináptico del neurotransmisor y una consecuente sobreactivación del sistema nervioso que ocasiona una sensación de bienestar. Estas implicaciones fisiológicas pueden generar un efecto tóxico a nivel del SNC e inclusive provocar la muerte, por lo que es importante tener claro que la toxicidad no es independiente a la recompensa que pueden generar algunas sustancias. (11)

2.4. Toxicidad

La toxicología es definida como el estudio que se encarga de identificar y cuantificar los efectos tóxicos o adversos asociados a la exposición con algún agente, como bien lo pueden ser fármacos o sustancias de abuso. Por otra parte, la toxicidad es definida como la capacidad intrínseca de una sustancia a producir una desviación, o bien, un efecto dañino sobre el funcionamiento normal del organismo, incluyendo la muerte. (12)(13)

2.5. Memoria

La memoria es un proceso biológico asociado a funciones cerebrales que se relaciona con la retención de conocimiento que se obtiene a través de un proceso de aprendizaje, mismo que es definido como un proceso de adquisición de información. (14)

Estudios sugieren que la memoria puede dividirse de forma general en dos categorías, la primera es la memoria explícita o declarativa, que esta desarrollada en vertebrados y es relacionada con el recuerdo consciente sobre el reconocimiento de objetos físicos, lugares y personas; la segunda, la memoria implícita o no declarativa incluye el recuerdo inconsciente de habilidades motoras, condicionamiento, sensibilización y habituación.(14)(15)

Otra clasificación más difundida sobre la memoria es la de memoria a corto y largo plazo, que como su nombre lo indica esta relacionada con el tiempo en el que la memoria actúa o permanecen los recuerdos derivados de la misma. Desde un punto de vista biológico, esencialmente la diferencia entre una y otra es que la memoria de largo plazo involucra síntesis proteica en el hipocampo, mientras que la memoria a corto plazo no tiene esta implicación. (16)

Existe evidencia alrededor de la memoria se ha descrito la participación del sistema colinérgico, el sistema NMDA/glutamato, la vía dopaminérgica y serotoninérgica. (17) Así mismo, una de las moléculas que han sido asociadas a la mejora de la memoria es el piracetam (18) y de forma contraria a este la escopolamina se caracteriza por poseer un efecto amnésico. (19)

2.6. *N*-bencilpiperazina y *N*-benciletilendiamina

N-bencilpiperazina (BZP) es un derivado de la familia de las piperazinas *N*-sustituidas, al cual se le ha atribuido, en un contexto social, como una sustancia estimulante y adictiva en Europa desde 1990. En la actualidad, la manufactura, importación-exportación, venta o consumo se encuentra altamente regulado en países europeos. (20)(21)

En México, BZP se añadió a la lista de sustancias que no deben ser comercializadas indiscriminadamente en 2014 por las autoridades sanitarias (COFEPRIS), debido a los efectos similares a las anfetaminas que presenta sola o en combinación con otras sustancias de abuso. (22)

Diferentes metabolitos de BZP han sido reportados, entre ellos el *p*-hidroxibencilpiperazina, *m*-hidroxibencilpiperazina, 4'-hidroxi-3'-metoxi-bencilpiperazina y la *N*-benciletilendiamina (BEDA), respecto a esta última se ha reportado que posee la misma actividad biológica que BZP, además de ser uno de sus metabolitos principales. (23)(24)(25)

El metabolismo de BZP a BEDA no está descrito, sin embargo una propuesta para el mismo es que está mediado por una oxidación por los microsomas hepáticos, con el uso de NADPH y O₂, a través de una doble *N*-desalquilación.(25)

Como se muestra en la Figura 2, en primer instancia se adiciona un hidroxilo en posición α al nitrógeno no sustituido de la piperazina por el Cit P450, después se forma un intermediario inestable que se estabiliza por un efecto resonante, con la consecuente apertura del anillo de piperazina, posteriormente y de nueva cuenta el Cit P450 adiciona un hidroxilo a la cadena alifática unida al nitrógeno tri-sustituido. Lo anterior, por efecto de resonancia genera un segundo intermediario inestable, que se estabiliza con la pérdida de la cadena alifática para finalmente obtener a BEDA.(26)

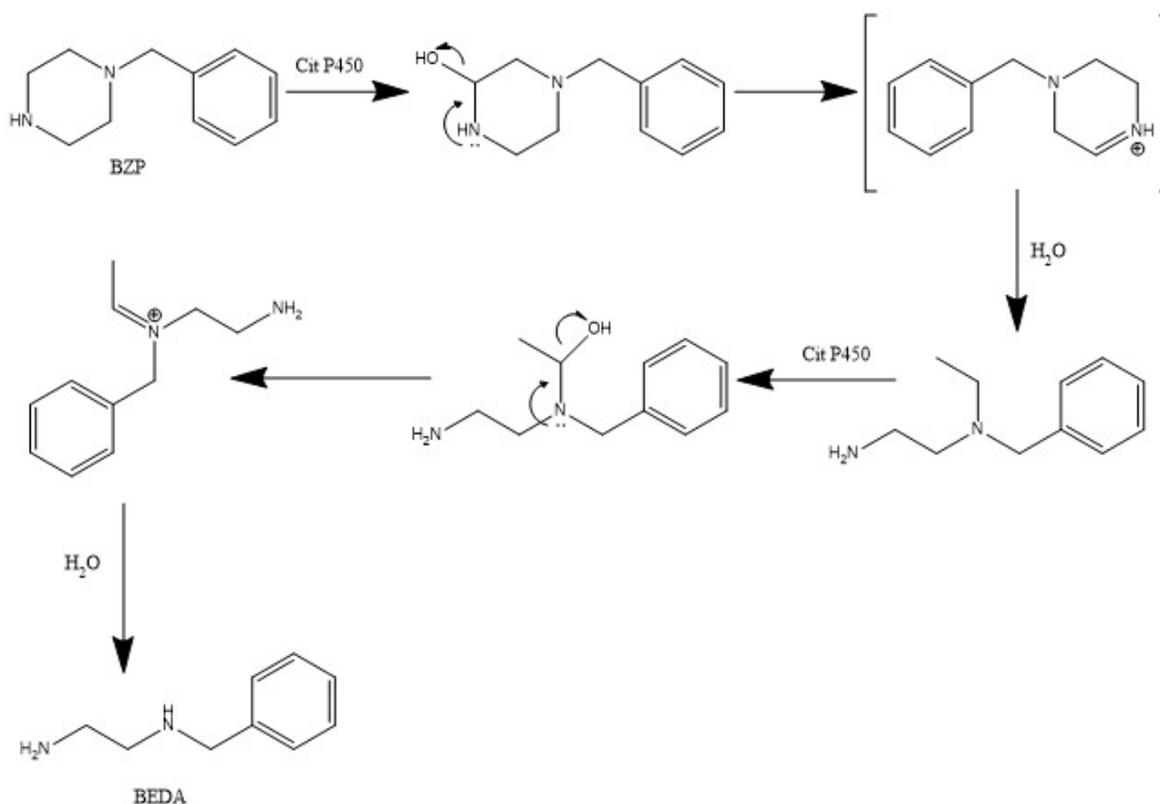


Figura 2. Ruta metabólica propuesta para el metabolismo de *N*-bencilpiperazina a *N*-benciletilendiamina

Aunque los mecanismos de acción de BZP y BEDA no han sido esclarecidos totalmente, se ha descrito que derivados de piperazina, como BZP, efectúan su acción biológica comportándose como liberadores de DA y 5-HT y se ha sugerido que utilizan los transportadores de dichos neurotransmisores para incrementar los niveles extracelulares de los mismos, así como la interacción con receptores de 5-HT.(27)

Estos mecanismos de acción y estudios previos han sugerido diferentes efectos asociados a BZP y BEDA a nivel de sistema nervioso central entre los que se encuentran el efecto ansiogénico (20), además de tener un efecto positivo en la adquisición y consolidación de la memoria en modelos murinos. (17)(24) Sin embargo, el enfoque respecto a las piperazinas cuando de memoria se trata, se ha sugerido que esta familia de moléculas interaccionan con los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A/2C} Y 5-HT₃, así como al propio transportador de serotonina. (28)(29)(30)

Además, en estudios clínicos han demostrado incrementar la presión sanguínea y aumentar el ritmo cardíaco.(31) En cuanto a toxicidad se han descrito diferentes efectos tóxicos de BZP similares a los anfetamínicos derivados de su uso como sustancia de abuso y en combinación con otros estimulantes, los cuales incluyen alteraciones a nivel central y sistémico. (32)

Sin embargo, se ha descrito que diversas benzilpiperazinas, entre ellas BZP producen efectos de recompensa tras usarse como sustancias de abuso en seres humanos.

Los efectos asociados a BZP y BEDA descritos arriba son atribuidos al mecanismo de acción que presentan con el consecuente incremento en la actividad serotoninérgica y dopaminérgica que estas moléculas producen.(33)

2.7. Serotonina

La 5-hidroxitriptamina (*5-HT*) o serotonina es una sustancia endógena que actúa como hormona local en la vasculatura periférica y es uno de los neurotransmisores más relevantes. La *5-HT* se encuentra presente de forma representativa en tres funciones del organismo: en el sistema digestivo se encuentra aproximadamente el 90% de este neurotransmisor, principalmente en células enterocromafines y las células nerviosas del plexo mientérico, también se localiza en plaquetas donde cumple su función en el proceso de coagulación sanguínea y finalmente en el SNC, donde se localiza en altas concentraciones en el mesencéfalo. (9)

La *5-HT* es biosintetizada a partir del aminoácido esencial *L*-triptófano a través de la triptófano hidroxilasa para convertirlo a 5-hidroxitriptófano, consecuentemente la *L*-aminoácido aromático descarboxilasa lo transforma en la *5-HT*. (9)(8)

Se han descrito 7 familias de receptores de *5-HT*, mismos que son de tipo metabotrópico a excepción del receptor *5-HT₃* que es un receptor asociado a un canal iónico. Adicionalmente, se han descrito subtipos de receptores dentro de las mismas familias ya establecidas, dichos receptores participan en diferentes procesos fisiológicos y neurológicos, entre los que destacan la aparición de ansiedad, la memoria, la recompensa, entre otros.(34)

Los receptores se encuentran descritos y funciones en el organismo se presentan en las Tablas 1 y 2.

Familia	Acción en SNC	Tipo de Receptor	Mecanismo de Acción
<i>5-HT₁</i>	Inhibición	Acoplado a proteína Gi	Decremento de AMPc
<i>5-HT₂</i>	Excitación	Acoplado a proteína Gq	Incremento de IP ₃ y DAG
<i>5-HT₃</i>	Excitación	Acoplado a Canal Iónico	Despolarización de membrana
<i>5-HT₄</i>	Excitación	Acoplado a proteína Gs	Incremento de AMPc
<i>5-HT₅</i>	Inhibición	Acoplado a proteína Gi	Decremento de AMPc
<i>5-HT₆</i>	Excitación	Acoplado a proteína Gs	Incremento de AMPc
<i>5-HT₇</i>	Excitación	Acoplado a proteína Gs	Incremento de AMPc

Tabla 1. Familias de receptores de *5-HT* (34)

Subtipo	Función
<i>5-HT_{1A}</i>	Ansiogénesis, agresión, memoria, adicción, termoregulación, comportamiento sexual, sueño.
<i>5-HT_{1B}</i>	Agresividad, ansiogénesis, aprendizaje, adicción, locomoción, memoria, comportamiento sexual.
<i>5-HT_{1D}</i>	Locomoción, ansiogénesis.
<i>5-HT_{1E}</i>	Memoria
<i>5-HT_{1F}</i>	Locomoción
<i>5-HT_{2A}</i>	Ansiogénesis, apetito, adicción, cognición, aprendizaje, memoria, percepción, comportamiento sexual, sueño, termoregulación.
<i>5-HT_{2B}</i>	Ansiogénesis, apetito, sueño.
<i>5-HT_{2C}</i>	Ansiogénesis, apetito, adicción, locomoción, sueño, termoregulación.
<i>5-HT_{3A}, 5-HT_{3B}</i>	Ansiogénesis, adicción, emesis, aprendizaje, memoria.
<i>5-HT_{4A-H}</i>	Ansiogénesis, apetito, aprendizaje, memoria, funciones respiratorias.
<i>5-HT_{5A}</i>	Locomoción, sueño.
<i>5-HT₆</i>	Ansiedad, cognición, aprendizaje, memoria.
<i>5-HT₇</i>	Ansiogénesis, memoria, funciones respiratorias, sueño, termoregulación.

Tabla 2. Subtipos de familias de receptores de *5-HT* (34)(35)(36)(8)

2.8. Dopamina

La Dopamina (DA) es un neurotransmisor que es biosintetizado a partir del aminoácido *L*-tirosina, estructuralmente es una fenilamina perteneciente a la familia de las catecolaminas. Biológicamente controla funciones motoras, de cognición, etológicas, placer y recompensa.(9) (8)

DA es biosintetizada a partir de la *L*-Fenilalanina, que por medio de la fenilalanina hidroxilasa es convertida a *L*-tirosina, que a su vez por la tirosina hidroxilasa es transformada a *L*-DOPA. Esta última por medio de la enzima *L*-aminoácidos aromáticos descarboxilasa es convertida finalmente en DA.(8)

Los receptores de dopamina son agrupados en dos familias de receptores metabotrópicos, localizados ampliamente en el SNC, las características de los receptores se describen en la Tabla 3.

Familia	Receptor	Acción en SNC	Proteína Asociada	Mecanismo de Acción
D1	D1	Excitatorio	Gs	Aumento AMPc
	D5	Excitatorio	Gs	
D2	D2	Inhibitorio	Gi	Decremento AMPc
	D3	Inhibitorio	Gi	
	D4	Inhibitorio	Gi	

Tabla 3. Receptores de Dopamina(8)(37)

Las alteraciones en los niveles de DA han sido relacionadas con diversos trastornos neurológicos como la ansiedad, depresión, bipolaridad, enfermedad de Parkinson, déficit de atención y adicción, por un aumento del neurotransmisor en el espacio sináptico. Lo anterior se lleva a cabo mediante dos vías que involucran al transportador de DA (DAT), cuya función es introducir DA del espacio presináptico a la célula neuronal. El primer mecanismo es la inhibición de DAT, y el segundo mecanismo es propiamente un mecanismo de eflujo, donde se estimula el transporte inverso de DA intracelular. Ambos procesos ocasionan una acumulación del neurotransmisor en el espacio extracelular. (38)

2.9. Perfil de Actividad Biológica

La bioinformática es una disciplina que en las últimas décadas ha cobrado auge para la investigación biológica, una de sus aplicaciones es en el campo del diseño de nuevos fármacos, así como en generar algoritmos para sugerir perfiles acerca de la actividad biológica, toxicidad y metabolismo de fármacos.

Conocer el perfil de actividad biológica de una entidad química por métodos bioinformáticos, tiene gran potencial hoy en día, ya que permite el enfoque en estudios dirigidos, ahorrando tiempo y dinero en investigación y acelerando el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos. Los perfiles de actividad generados mediante bioinformática, permiten discernir entre las posibles actividades de una molécula e incluso en la confirmación de una posible actividad a raíz de estudios experimentales previos. (39)

Es importante señalar que el concepto de espectro de actividad biológica representa teóricamente una estimación cuantitativa del potencial de ser activo o inactivo, esta representación cuantitativa permite integrar información acerca de compuestos activos y su estructura química con las moléculas que queremos generar el perfil de su actividad.(40)

3. Justificación

En estudios previos se ha descrito que BZP y BEDA, producen efecto ansiogénico y sobre la consolidación de memoria en ratones (24), sin embargo, resulta necesario evaluar dicha actividad en otros modelos animales, como el pez cebra, el cual ha demostrado ser un modelo robusto en la evaluación neurofarmacológica.(3)

Lo anterior permitirá establecer las metodologías experimentales en pez cebra para la evaluación de la ansiedad, recompensa, consolidación de la memoria y toxicidad aguda para compuestos con actividad farmacológica en el SNC.

4. Hipótesis

N-bencilpiperazina (BZP) y *N*-benciletilendiamina (BEDA) presentarán un efecto ansiogénico y tendrán un efecto positivo en la consolidación de la memoria en *Danio rerio*, de acuerdo a los estudios realizados previamente en modelos murinos. Adicionalmente, *N*-benciletilendiamina no presentará el efecto adictivo que esta asociado a *N*-bencilpiperazina al ser estructuralmente diferentes.

Lo anterior permitirá establecer métodos para la evaluación de ansiedad, efecto sobre la consolidación de la memoria, efecto sobre la recompensa y estimación de la DL₅₀ en *Danio rerio*.

5. Objetivos

5.1. Objetivo General

- Establecer las metodologías experimentales que permitan evaluar el efecto ansiogénico, el efecto sobre la recompensa, toxicidad y la consolidación de la memoria producidos por *N*-bencilpiperazina y su metabolito *N*-benciletilendiamina en *Danio rerio*.

5.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto ansiogénico mediante una prueba conductual de claro-oscuro
- Evaluar efecto sobre la recompensa en un modelo basado en el cambio de sitio de preferencia condicionado (CSPC)
- Determinar la toxicidad aguda mediante el cálculo de la dosis letal 50 (DL₅₀) usando el método de Lorke
- Evaluar el efecto sobre la consolidación de la memoria a través de un modelo de evitación pasiva
- Obtener el perfil de actividad biológica a través de descriptores estructurales conocidos como Multilevel Neighbourhoods of Atoms (MNAs) y vincularlos con los resultados obtenidos experimentalmente.

6. Materiales y métodos

6.1. Animales

Todos los experimentos se realizaron en ejemplares adultos de *Danio rerio* de ambos sexos con un peso promedio de 0.5 ± 0.2 g.

Los animales se obtuvieron de Acuario Medina S.A. de C.V. (CDMX, México), se mantuvieron en una pecera de 40 L provista de aereación, control de temperatura de 27 ± 2 °C, alimentación cada 12 horas con una dieta comercial y un ciclo de luz-obscuridad de 12 horas.

6.2. Fármacos y reactivos

N-bencilpiperazina y *N*-benciletilendiamina fueron sintetizados e identificados en el departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, de acuerdo a las rutas sintéticas estándares para la obtención de derivados de piperazina. (41)

Los fármacos de referencia empleados: Caféina, Diazepam, Piracetam y Escopolamina fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis Mo. USA)

6.3. Diseño Experimental

6.3.1. Administración de fármacos

En todos los experimentos los fármacos y compuestos de prueba se administraron por vía intraperitoneal, ya que se ha descrito que esta vía resulta ser novedosa y adecuada para la evaluación biológica de compuestos con acción en SNC en *Danio rerio*. (42).

Los fármacos se solubilizaron en SSI, excepto Diazepam que se cosolubilizó en SSI con 30% de etanol.

La administración se llevó a cabo a una razón de 10 μ L/g de peso del pez, previa inmovilización del animal en agua del tanque a una temperatura de 8-10 °C.(43) Una vez inmovilizados los animales, se expusó la parte peritoneal para la administración que fue realizada con una microjeringa Hamilton de 50 μ L adaptada con una aguja calibre 31G.

6.3.2. Evaluación de la ansiedad

Se han descrito diferentes métodos de evaluación de la ansiedad en roedores, mismos que han sido adaptados para la evaluación en *Danio rerio*. Dentro de los más comunes se encuentran la prueba de laberinto elevado, el ensayo de campo abierto, condicionamiento de miedo y por último el ensayo claro/oscuro, mismo que ha sido empleado ampliamente en *D. rerio* debido a la robustez de los fenotipos que pueden analizarse en este ensayo, razón por la cual fue la prueba utilizada para evaluar la ansiedad en BZP y BEDA. (44)(45)

La prueba de claro oscuro involucra 7 parámetros conductuales que conforman un etograma característico asociado a un efecto ansiogénico o ansiolítico. Dichos parámetros son presentados en la Tabla 4, de acuerdo a la literatura. (44)(6)(46)(47)(48)(45)

Parámetro	Definición	Etograma en efecto ansiolítico	Etograma en efecto ansiogénico
Scototaxia	Tiempo en segundos que el pez pasa en el compartimiento oscuro del aparato	Disminuye	Aumenta
Latencia	Tiempo en segundos que el pez tarda en cruzar del compartimiento oscuro al claro	Disminuye	Aumenta
Número de entradas al compartimiento claro	Número de veces que el pez cruza con hasta 2/3 de su cuerpo del compartimiento oscuro al claro	Aumenta	Disminuye
Número de nados erráticos	Número de nados rápidos y sin dirección fija que efectúa el pez	Disminuye	Aumenta
Número de entradas de evaluación del riesgo	Número de veces que el pez cruza con hasta 2/3 de su cuerpo del compartimiento oscuro al claro y retorna en menos de un segundo	Disminuye	Aumenta
Tiempo de congelamiento	Tiempo en segundos que el pez esta sin efectuar nados y permanece en un lugar fijo	Disminuye	Aumenta
Tigmotaxia	Tiempo en segundos que el pez nada a menos de 2 cm de las paredes del compartimiento claro	Disminuye	Aumenta

Tabla 4. Definición de parámetros conductuales y descripción de los etogramas característicos del efecto ansiogénico y efecto ansiolítico

6.3.3. Evaluación del efecto sobre la recompensa

El método de cambio de sitio de preferencia condicionado (CSPC) en pez cebra es un modelo robusto para la evaluación de las propiedades de recompensa de diferentes sustancias.

Ninkovic y colaboradores han evaluado con la prueba de CSPC el efecto sobre la recompensa asociada a la metanfetamina que estructural y farmacofóricamente tiene similitud con BZP. (49)(33) Debido al estudio antes señalado, se evaluó el efecto sobre la recompensa de las moléculas BZP y BEDA empleando la prueba CSPC.

Esta prueba requiere de un aparato con dos compartimientos diferenciados entre sí y comprende tres grandes etapas consecutivas, la primera etapa consiste en un período de adaptación donde el animal explora el aparato de prueba, posteriormente se evalúa cuanto tiempo permanece en cada uno de estos compartimientos y de esta forma determinar el sitio de preferencia basal. Posterior a esto los animales son restringidos a uno de los compartimientos en específico donde reciben la sustancia que se esta evaluando, para finalizar se determina nuevamente el sitio de preferencia y de esta forma conocer si el tratamiento modificó el sitio de preferencia basal, lo que sugeriría un efecto de recompensa. (50)

6.3.4. Evaluación sobre la consolidación de la memoria

Experimentalmente, la evaluación en modelos animales como *Danio rerio* y modelos murinos implica un entrenamiento del animal y posteriormente la prueba. La finalidad del entrenamiento es generar un proceso de aprendizaje.

Visto desde este punto podemos evaluar tres grandes procesos de la memoria: *Adquisición*, *Formación* y *Consolidación*, la diferencia entre ellas existe por el momento donde ocurre la administración de la sustancia a evaluar.

Se evalúa adquisición de la memoria cuando el fármaco es administrado antes del período de entrenamiento, la formación se evalúa cuando la administración del fármaco ocurre justamente al finalizar el período de entrenamiento y por último la consolidación se evalúa cuando la administración del fármaco es previa al período de prueba, siendo esta última metodología la empleada en la evaluación de BZP y BEDA en el presente trabajo.(16)

6.3.5. Determinación de la toxicidad aguda

Para realizar estudios toxicológicos, existen diferentes alternativas, sin embargo, muchas de ellas incluyen una gran cantidad de animales de experimentación, por lo que hoy en día se han implementado técnicas nuevas y se han refinado algunas otras para la evaluación de la toxicidad.

Por tal motivo se empleó el algoritmo propuesto por Lorke que es un método que permite evaluar la toxicidad aguda por medio de la estimación de la DL_{50} de una forma rápida y con la ventaja de que no se utilizan muchos animales a comparación de los métodos tradicionales para realizar esta determinación. (51)(52)

6.3.6. Obtención del perfil de actividad biológica

La obtención de un espectro de actividad biológica de una molécula se lleva a cabo a través de descriptores estructurales conocidos como Multilevel Neighbourhoods of Atoms (MNAs), que son establecidos por la estructura química del compuesto, de los tipos de átomos que la componen, incluyendo los átomos de hidrógeno considerando la valencia y carga parcial de cada átomo individual, sin tomar en cuenta los tipos de enlace presentes. (39)(53)(54)

Los descriptores MNAs permiten establecer un algoritmo de predicción siguiente, donde pr_j es la probabilidad de cada actividad de j bajo el algoritmo siguiente. (53)

$$Pr_j = (1 + (S_j - S_0) / (1 - S_j S_{0j})) / 2$$

Considerando $S_j = \text{sen}(U_j/m)$, $S_{0j} = \text{sen}(U_{0j}/m)$

$$U_j = \sum_i \text{sen}^{-1}[r_i(2p_{ij}-1)] \quad , \quad U_{0j} = \sum_i \text{sen}^{-1}[r_i(2p_j-1)]$$

$$P_j = n_j/n \quad , \quad P_{ij} = n_{ij}/n_i$$

Donde: m es el número de descriptores del compuesto en predicción, r_i es un factor de regulación, p_j es un estimado a priori de la probabilidad de actividad j , p_{ij} es un estimado de la actividad j para el descriptor i , n es el número total de compuestos activos con los cuales se compara la molécula en predicción, n_i es el número de compuestos que contienen el descriptor i , n_j es el número de compuestos que contienen el descriptor j , y finalmente, n_{ij} es el número de compuestos que contienen el descriptor i y además tienen la actividad j .

De esta forma, el perfil de actividad biológica se genera y esquematiza como una lista que contiene las posibles actividades, P_a (Probabilidad de actividad) y P_i (Probabilidad de Inactividad); donde $P_a > 0.7$ representa un compuesto que potencialmente puede exhibir la actividad indicada de forma experimental confirmando los resultados experimentales. (53)

6.4. Metodología

6.4.1. Prueba de claro-oscuro

Los experimentos consistieron en un ensayo conductual de claro/oscuro siguiendo el procedimiento descrito por Maximino y colaboradores (44). El aparato de experimentación y sus dimensiones se muestran en la Figura 3, la altura del agua en el aparato fue de 10.0 cm. Posterior a la administración se realizó un período de aclimatación de 3 minutos en el compartimiento central del aparato, pasado este lapso, se retiró el compartimiento lo que permitió un nado libre al pez durante 15 minutos, mismos que fueron videograbados para su posterior análisis de acuerdo a los etogramas descritos en la tabla 4.

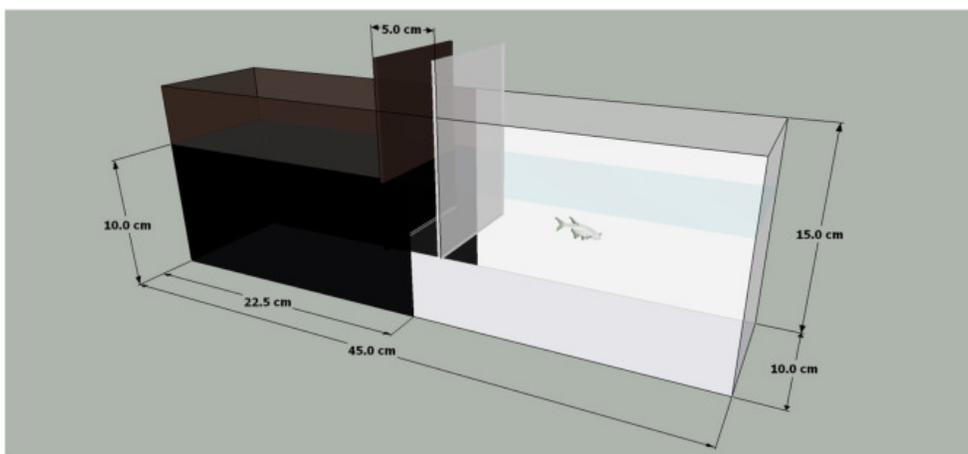


Figura 3. Aparato de Experimentación empleado en la evaluación de la ansiedad.
Imagen de Magno y colaboradores (55)

Un grupo testigo se utilizó para explorar el efecto ansiogénico de la cafeína a las dosis de 1 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg. Mientras que para el efecto ansiolítico el fármaco de referencia fue diazepam a las dosis de 2.5 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg, mismo que fue disuelto en SSI al 30% de EtOH. En tanto que, BZP y BEDA se evaluaron a las dosis de 1 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg.

6.4.2. Prueba del cambio de sitio de preferencia condicionado (CSPC)

Se realizó el ensayo conductual descrito por Ninkovic y colaboradores.(49)

El experimento consiste en un período de 9 días empleando el aparato de experimentación que se muestra en la Figura 4, el cual presenta una distancia entre el fondo del aparato y la superficie del agua de 10.0 cm.

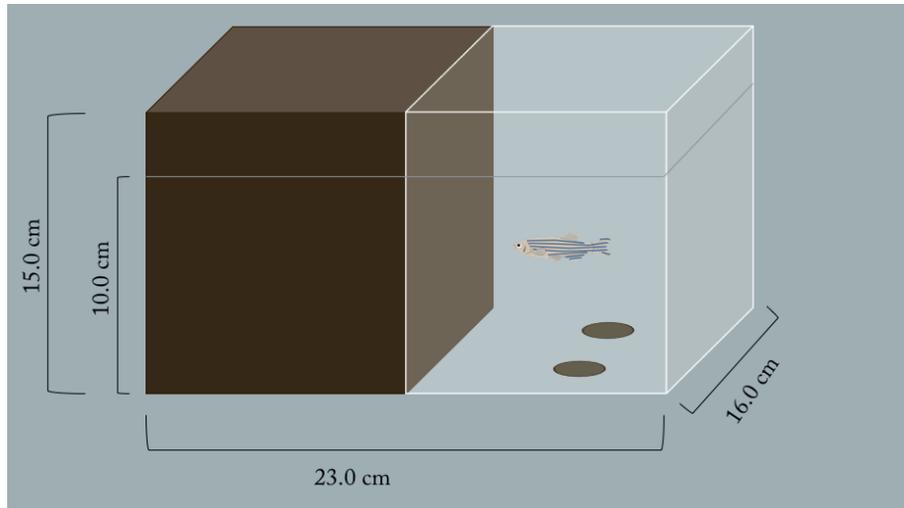


Figura 4. Aparato de experimentación empleado en la determinación del efecto de recompensa

Los días de duración del experimento fueron distribuidos de la forma siguiente.

Un período de acondicionamiento de 2 días al aparato de prueba. La determinación del sitio de preferencia inicial en el tercer día para lo cual se videograbó al pez durante 15 minutos, el video se analizó cuantificando el tiempo que permanece el pez en cada uno de los compartimentos del aparato siendo donde permanece mayor tiempo el sitio de preferencia inicial.

Posteriormente el tratamiento se administró, el cual consistió en una administración del compuesto el cuarto día. En el quinto día se administró SSI y se alternó así hasta el octavo día de forma tal que cuando se administraba SSI se aislaba al pez en el sitio de preferencia inicial durante 45 minutos y al administrar el compuesto de prueba el pez era aislado en el sitio no preferido durante 45 minutos, con la finalidad de que el pez relacionará el efecto de la sustancia con el sitio no preferido, para después evaluar el sitio final de preferencia en el

noveno día de la misma forma en que se evaluó el sitio de preferencia inicial. Durante los días del experimento, los peces fueron aislados durante los períodos de no experimentación en espacios de color azul, con las condiciones del tanque de la pecera donde se encontraban antes de empezar el experimento.

El experimento se esquematiza en la Figura 5.



Figura 5. Línea temporal de la evaluación del efecto de recompensa mediante un ensayo del cambio de sitio de preferencia condicionado. SSI: Solución Salina Isotónica; Tx: Tratamiento

Finalmente, se calculó el porcentaje en el cambio de sitio de preferencia de acuerdo al siguiente algoritmo

$$\% \text{CSPC} = 100 \cdot \frac{(\text{PP} - \text{CPP})}{\text{PP}}$$

Donde, PP es el tiempo en el sitio de preferencia antes del tratamiento y CPP es el tiempo en el sitio de preferencia condicionado, es decir después del tratamiento.

Con la metodología descrita se evaluaron BZP y BEDA a las dosis de 1 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg, además de un grupo control al cual se le administró como tratamiento SSI.

6.4.3. Prueba de evitación pasiva

La parte experimental respecto a la evaluación en la consolidación de la memoria por evitación pasiva se realizó con base en el trabajo de Kim y colaboradores(19)(56), que consiste en un entrenamiento y posterior al mismo la prueba, empleando el aparato que se muestra en la Figura 6. (19)(56)

Inicialmente se realizó el entrenamiento a continuación descrito.

La puerta central del aparato se cerró y el compartimiento 2 se mantuvo en obscuridad, se colocó al pez en el compartimiento 1 durante tres minutos de aclimatación, posteriormente se encendió la luz del compartimiento 2 y se retiró la puerta, se midió la latencia del pez para entrar al segundo compartimiento y tres segundos después de hacerlo se dejó caer una pelota de goma frente al pez. Con una red se hizo pasar al pez de nueva cuenta al compartimiento 1. Lo anterior se repitió en tres ocasiones que consistieron en los entrenamientos (E1, E2 y E3 respectivamente), para después de 2 horas realizar la prueba, que consistió en el mismo procedimiento que se describe arriba, pero solo en una ocasión y sin introducir la pelota al aparato de experimentación. La administración de los fármacos se realizaron 15 minutos antes de realizar la prueba.

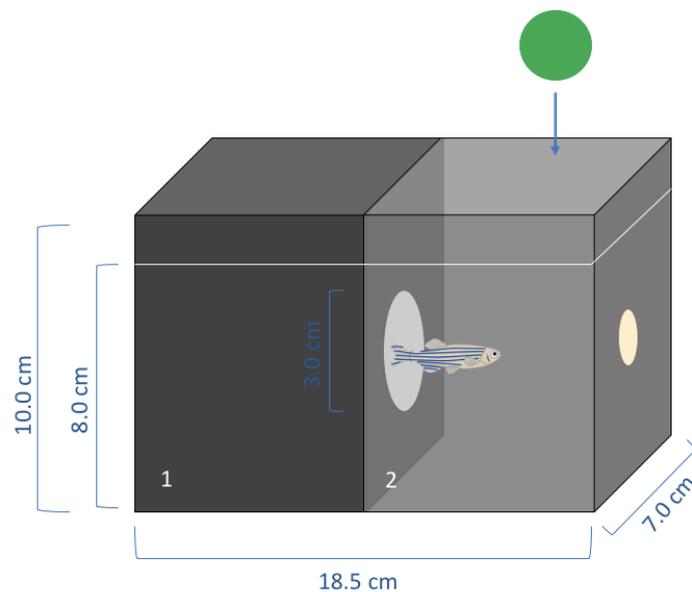


Figura 6. Aparato empleado en la evaluación de la consolidación de la memoria

Piracetam se evaluó como grupo testigo en la consolidación de la memoria a las dosis de 3 mg/kg y 10 mg/kg. Mientras que para el grupo testigo del efecto amnésico se empleó a escopolamina a las dosis 0.025 mg/kg y 0.1 mg/kg, además se evaluó el vehículo (SSI) de los dos testigos empleados. BZP y BEDA fueron evaluados a las dosis 1 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg.

6.4.4. Determinación del parámetro de la DL₅₀

Para evaluar la toxicidad aguda se determinó el parámetro de la DL₅₀ de BZP y BEDA siguiendo el método de Lorke para su estimación, durante un período de 14 días empleando la administración intraperitoneal.

El método de Lorke se divide en dos etapas, la primera comprende la evaluación de tres dosis logarítmicamente espaciadas (10 mg/kg, 100 mg/kg y 1000 mg/kg), usando tres animales en cada una, esto con la finalidad de seleccionar el rango donde se continuará evaluando la toxicidad en la segunda etapa usando un solo animal por dosis. Para lo anterior, Lorke estableció un algoritmo donde se seleccionan las siguientes dosis a evaluar dependiendo el patrón de muerte presentado en la primera etapa (Tabla 5).

Finalmente, se calculó la DL₅₀ estimada obteniendo la media geométrica de las dosis que representó el 0% y 100% de muertes, respectivamente en la segunda etapa. En el caso donde el patrón presentado no se ajuste al algoritmo de Lorke se realizó el cálculo mediante análisis probit. (51)

Dosis Empleadas en la Primera Etapa (mg/kg)			Dosis a Usar en la Segunda Etapa (mg/kg)			
10	100	1000				
0/3*	0/3	0/3		1600	2900	5000
0/3	0/3	1/3	600	1000	1600	2900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

*Patrón de muerte de los animales (número de animales muertos/ número de animales empleados)

Tabla 5. Algoritmo propuesto por Lorke para la estimación de DL50 (51)

6.4.5. Obtención del perfil de actividad biológica

El perfil de actividad biológica de BZP y BEDA se realizó basado en la similitud estructural, por medio del software PASS “Prediction of Activity Spectra for Substances” (disponible en: <http://www.way2drug.com/>), de esta forma y mediante un algoritmo de predicción con base en descriptores MNAs de BZP y BEDA, el perfil obtenido se filtró a un $Pa > 0.7$, para obtener las actividades más probables para las moléculas.

Los MNAs son calculados de forma automática por el software a partir del código SMILE de las moléculas, los anteriores fueron obtenidos de la base de datos ChemBL del Instituto Europeo de Bioinformática (disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>).

7. Resultados

7.1. Evaluación de la ansiedad

Los resultados obtenidos se analizaron con base en el etograma previamente descrito en la metodología (Tabla 4). Dicho etograma sirvió para evaluar los grupos de los fármacos testigos y de esta forma usar las dosis que presentaran el efecto ansiogénico característico en el caso de cafeína y ansiolítico en el caso de diazepam (Figura 7A-Figura 7G).

En cuanto al número de entradas al espacio claro, la dosis de 30 mg/kg de cafeína disminuyó significativamente respecto al grupo de SSI ($p < 0.05$), caso opuesto a la dosis de 10 mg/kg de diazepam que aumento de forma significativa ($p < 0.05$) como se muestra en la figura 7A.

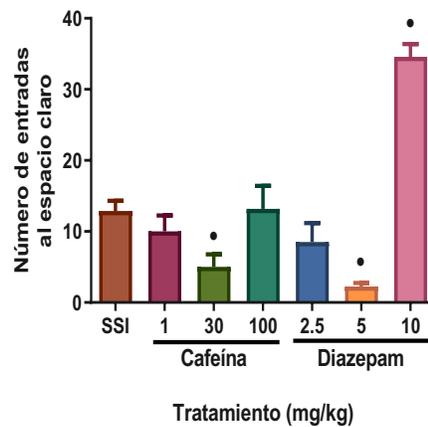


Figura 7A. Número de entradas al espacio claro en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.

SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnett. *Se observa diferencia significativa respecto a SSI; $p < 0.05$; $n \geq 6$

El parámetro de scototaxia se vió aumentado para cafeína a las dosis de 1 mg/kg y 30 mg/kg sin tener diferencia estadística ($p < 0.05$) en relación con el grupo tratado con SSI, lo que sugiere un efecto de tipo ansiogénico. En el caso de diazepam las dosis de 5 mg/kg y 10 mg/kg disminuyeron significativamente respecto al grupo control ($p < 0.05$), comportamiento típico de un efecto ansiolítico para este ensayo. (Figura 7B)

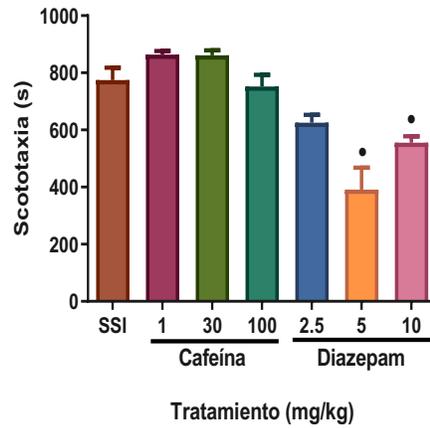


Figura 7B. Scototaxia en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.

SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnett. • Se observa diferencia significativa respecto a SSI; $p < 0.05$; $n \geq 6$

En tanto a la latencia de entrada al espacio claro, cafeína (30 mg/kg) provocó un incremento con significancia estadística respecto al grupo control ($p < 0.05$), mientras que diazepam a las tres dosis evaluadas disminuyó la latencia de los grupos evaluados significativamente ($p < 0.05$), incluso a una latencia cercana a cero. (Figura 7C)

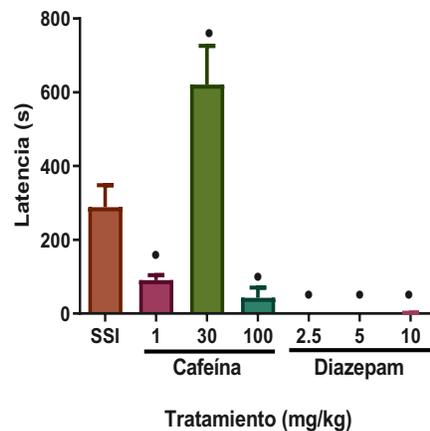


Figura 7C. Latencia de entrada al espacio claro en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.

SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnett. • Se observa diferencia significativa respecto a SSI; $p < 0.05$; $n \geq 6$

El tiempo de congelamiento aumentó para cafeína a la dosis de 30 mg/kg y disminuyó en el caso de diazepam de 10 mg/kg de forma significativa respecto al grupo control tratado con SSI ($p < 0.05$). (Figura 7D)

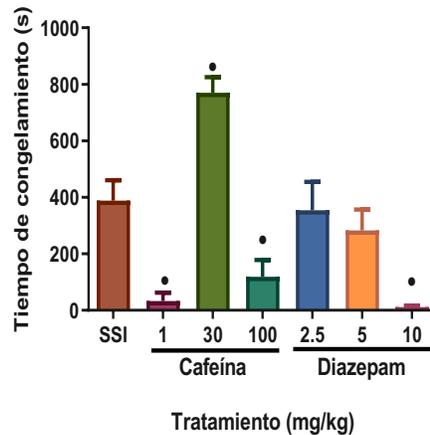


Figura 7D. Tiempo de congelamiento en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.

SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. • Se observa diferencia significativa respecto a SSI; $p < 0.05$; $n \geq 6$

El número de nados erráticos aumento para las tres dosis evaluadas de cafeína teniendo diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al grupo control a las dosis de 30 mg/kg y 100 mg/kg. En el caso del fármaco testigo del efecto ansiolítico diazepam los tres grupos evaluados disminuyeron el número de nados erráticos teniendo las dosis de 2.5 mg/kg y 5 mg/kg una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto al control de SSI. (Figura 7E)

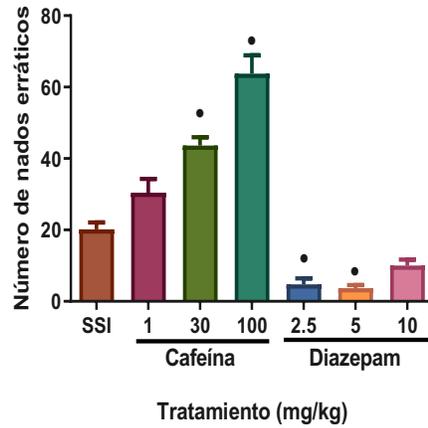


Figura 7E. Número de nados erráticos en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.

SSI=Control. Se presenta la media ± EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnett. • Se observa diferencia significativa respecto a SSI; $p < 0.05$; $n \geq 6$

La proporción entre el número de nados de evaluación del riesgo y el número total de entradas al espacio blanco aumentó para el grupo tratado con cafeína a la dosis de 1 mg/kg teniendo diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0.05$); mientras que para las tres dosis evaluadas de diazepam, disminuyó significativamente ($p < 0.05$) respecto al grupo control de SSI. (Figura 7F)

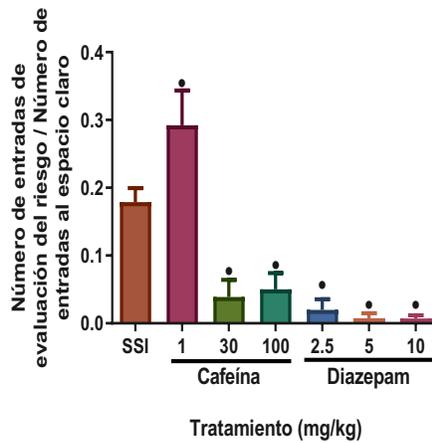


Figura 7F. Proporción del número de entradas de evaluación del riesgo respecto al número de entradas al espacio claro en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico.

SSI=Control. Se presenta la media ± EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnett. • Se observa diferencia significativa respecto a SSI; $p < 0.05$; $n \geq 6$

En cuanto a la proporción de tigmotaxia respecto al tiempo total dentro del espacio blanco, la dosis de 1 mg/kg de cafeína y la dosis de 5 mg/kg de diazepam aumentó y disminuyó significativamente el tiempo de tigmotaxia ($p < 0.05$) (Figura 7G).

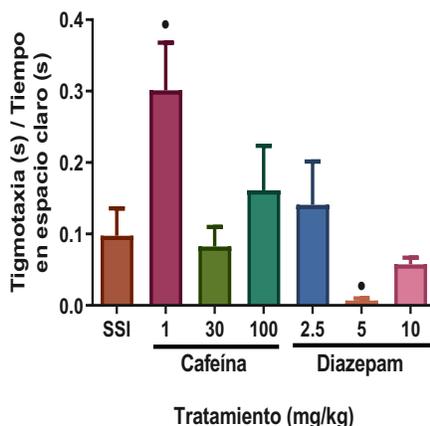


Figura 7G. Proporción de tigmotaxia respecto al tiempo en espacio claro (G) en la evaluación de los grupos testigo cafeína para el efecto ansiogénico y diazepam para el efecto ansiolítico. SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Dunnett. • Se observa diferencia significativa respecto a SSI; $p < 0.05$; $n \geq 6$

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto ansiolítico/ansiogénico de BZP y BEDA son descritos a continuación:

En cuanto al parámetro de número de entradas al compartimento blanco, todas las dosis evaluadas de BZP provocaron una disminución de entradas. Solo la dosis de 100 mg/kg presentó diferencia significativa respecto al grupo control ($p < 0.05$), en tanto que el grupo testigo del efecto ansiolítico tratado con diazepam (10 mg/kg) aumentó el número de entradas, lo que indica un efecto ansiogénico para BZP, lo mismo que la cafeína (30 mg/kg)(Figura 8A). En cuanto a BEDA ninguna dosis presentó diferencia significativa respecto al grupo tratado con el vehículo de SSI, por lo que no se presentó efecto sobre el número de entradas (Figura 8A).

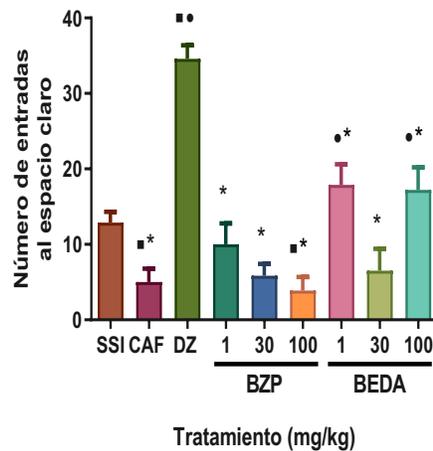


Figura 8A. Número de entradas al espacio claro en la evaluación de BZP y BEDA. CAF= Cafeína, DZ= Diazepam SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. ■Se observa diferencia significativa respecto a SSI • Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiogénico, *Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiolítico; $p < 0.05$; $n \geq 6$

En cuanto al parámetro scototaxis las tres dosis evaluadas de BZP y la dosis de 30 mg/kg de BEDA aumentaron, sin embargo, no presentaron diferencia frente al grupo control de SSI ($p < 0.05$) (Figura 8B). Lo anterior se debe a la preferencia natural que posee el pez a permanecer en el compartimiento oscuro, además de que Maximino y colaboradores han descrito que la administración intraperitoneal causa estrés en el pez (48)

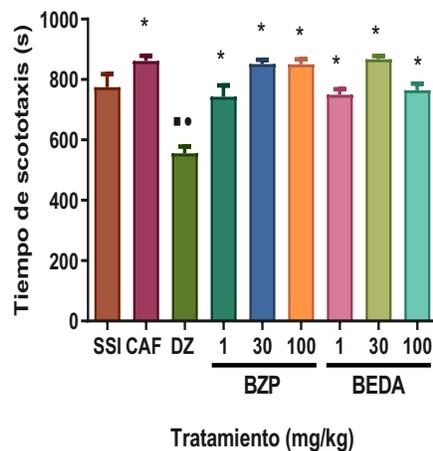


Figura 8B. Scototaxis en la evaluación de BZP y BEDA. CAF=Cafeína, DZ=Diazepam SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. ■Se observa diferencia significativa respecto a SSI • Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiogénico, *Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiolítico; $p < 0.05$; $n \geq 6$

En cuanto a la latencia se observa que en todas las dosis de BZP y BEDA la latencia disminuye sin presentar diferencia significativa con el grupo control de SSI ($p < 0.05$) (Figura 8C). Se ha descrito que el comportamiento de los peces respecto a este parámetro puede variar dependiendo de la procedencia de los peces (44), sin embargo desde una perspectiva experimental los peces presentaron estrés de forma tal que cruzaban a la parte blanca mediante un nado errático y regresaban al compartimiento oscuro en un tiempo corto, esto puede verse con la scototaxia que representa el tiempo que el pez estuvo en este espacio.

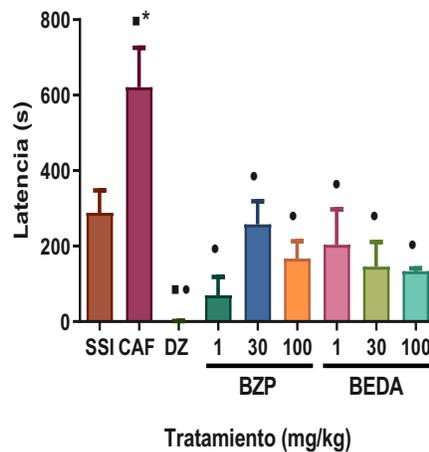


Figura 8C. Latencia en la evaluación de BZP y BEDA. CAF=Cafeína, DZ=Diazepam SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. ■ Se observa diferencia significativa respecto a SSI • Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiogénico, *Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiolítico; $p < 0.05$; $n \geq 6$

En el parámetro congelamiento (Figura 8D), todos los grupos de BZP y el grupo de 1 $\mu\text{g/g}$ y 100 mg/kg de BEDA, disminuyeron respecto al grupo de SSI, comportándose como el grupo testigo de efecto ansiolítico. Sin embargo desde el punto de vista de la experiencia en la realización de los experimentos, los peces presentaron una actividad locomotora importante, misma que en el caso de la dosis de BZP de 100 mg/kg puede verse reflejada en la cantidad de nados erráticos que presentaron (Figura 8E).

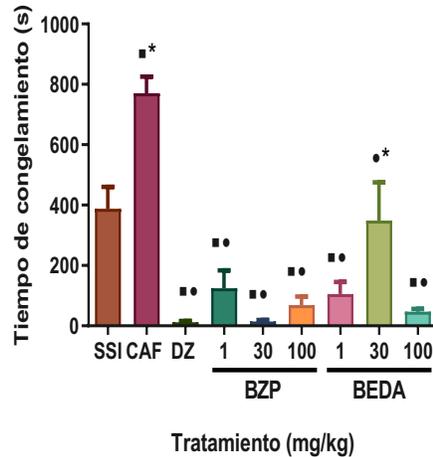


Figura 8D. Tiempo de congelamiento en la evaluación de BZP y BEDA. CAF=Cafeína, DZ=Diazepam SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. ■Se observa diferencia significativa respecto a SSI • Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiogénico, *Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiolítico; $p < 0.05$; $n \geq 6$

A la dosis de 100 mg/kg de BZP y a las dosis de 1 mg/kg y 100 mg/kg en el caso de BEDA, se presentó un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) respecto al grupo control en la cantidad nados erráticos efectuados comportándose de forma similar al grupo testigo de cafeína de 30 mg/kg, por lo que la actividad locomotora se vió aumentada, tal como es sugerido para un efecto ansiogénico (Figura 8E). (26)

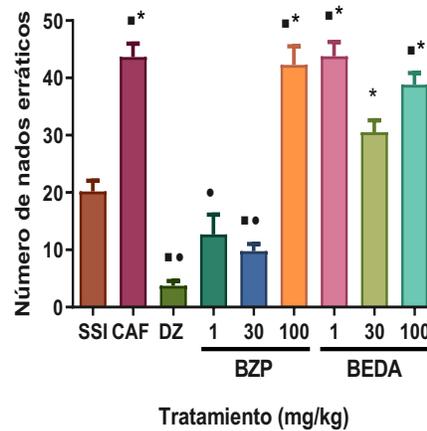


Figura 8E. Número de nados erráticos en la evaluación de BZP y BEDA. CAF=Cafeína, DZ=Diazepam SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. ■Se observa diferencia significativa respecto a SSI • Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiogénico, *Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiolítico; $p < 0.05$; $n \geq 6$

El número de entradas de evaluación del riesgo fue analizado con base en el número total de entradas al espacio blanco estableciendo una relación entre estos parámetros, de forma que fue posible describir la proporción de entradas de evaluación del riesgo. No se observó un efecto claro de acuerdo a la definición de este parámetro al evaluar a BZP y BEDA (Figura 8F).

Lo anterior debido a que desde un punto de vista experimental y con base en los demás parámetros previamente analizados, los animales presentaron un tiempo de scototaxia elevada (Figura 8B) implicando así que disminuya la cantidad de entradas totales y por ende la cantidad de entradas de evaluación del riesgo, que son los dos parámetros presentes en la relación antes descrita.

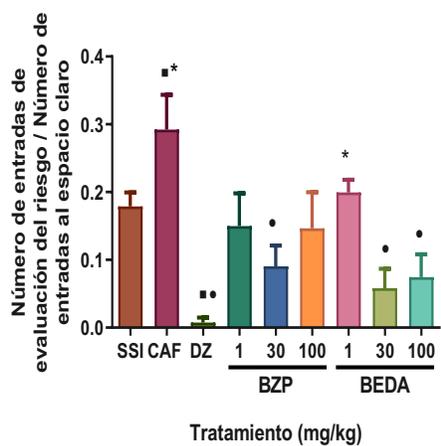


Figura 8F. Proporción del número de entradas de evaluación del riesgo respecto al número de entradas al espacio claro en la evaluación de BZP y BEDA. CAF=Cafeína, DZ=Diazepam SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. ■ Se observa diferencia significativa respecto a SSI • Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiogénico, * Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiolítico; $p < 0.05$; $n \geq 6$

Para el último parámetro se estableció de igual forma una relación entre la tigmotaxia y el tiempo total en el espacio blanco que como en el caso anterior, permite visualizar la proporción de tigmotaxia respecto al tiempo que el pez se encontró en el espacio claro. De esta forma los resultados con BZP sugieren un efecto ansiogénico a las dosis de 1 mg/kg y 30 mg/kg y para BEDA a las dosis de 1 mg/kg y 100 mg/kg al aumentar dicha proporción (Figura 8G), que en el caso de la dosis de 1 mg/kg BZP fue incluso mayor que el grupo testigo de cafeína.

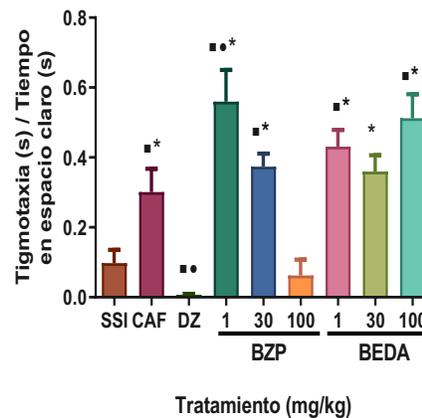


Figura 8G. Proporción de tigmotaxia respecto al tiempo en espacio claro (G) en la evaluación de BZP y BEDA. CAF=Cafeína, DZ=Diazepam SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. ■ Se observa diferencia significativa respecto a SSI • Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiogénico, * Se observa diferencia significativa respecto al grupo testigo de efecto ansiolítico; $p < 0.05$; $n \geq 6$

7.2. Evaluación sobre el efecto de recompensa

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto de recompensa por medio de la prueba del cambio de sitio de preferencia condicionado (CSPC) de BZP y BEDA puede observarse que BZP a la dosis de 100 mg/kg y BEDA a la dosis de 1 mg/kg, presentaron un aumento en el cambio de sitio de preferencia de forma significativa ($p < 0.05$) respecto al control de SSI. (Figura 9A-9B)

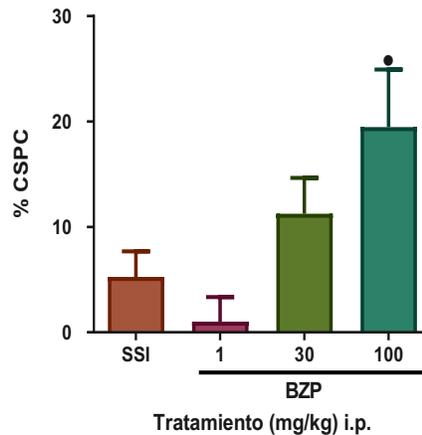


Figura 9A. Porcentaje de Cambio en el Sitio de Preferencia Condicionado por BZP SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. •Se observa diferencia significativa respecto a SSI; $p < 0.05$; $n \geq 6$

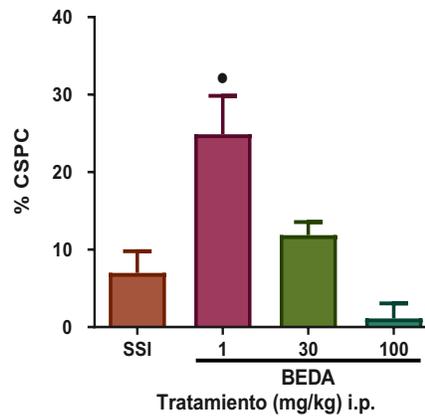


Figura 9B. Porcentaje de Cambio en el Sitio de Preferencia Condicionado por BEDA SSI=Control. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey. •Se observa diferencia significativa respecto a SSI; $p < 0.05$; $n \geq 6$

El efecto de recompensa fue evaluado por un modelo de cambio en el sitio de preferencia condicionado, es decir, se condicionó a los animales a relacionar el efecto de la sustancia con un sitio específico del aparato de prueba que en este caso fue compartimiento blanco. Por lo que después de una administración subaguda (durante 6 días, alternando con SSI) de los fármacos estudiados se observó un aumento entre el tiempo que permanece el pez dentro del espacio blanco antes y después del tratamiento descrito anteriormente, sugiere un efecto de recompensa al compuesto evaluado. (49)

De forma tal que se presentó un aumento significativo ($p < 0.05$) en cambio en el sitio de preferencia condicionado respecto al grupo control de SSI, un efecto que se traduce como efecto de recompensa a la dosis de 100 mg/kg de BZP, y a la dosis más baja de su metabolito BEDA de 1 mg/kg. Los efectos observados presentaron una tendencia a una respuesta dosis-dependiente para BZP y BEDA, solo que para este último la respuesta decrece al aumentar la dosis, este hecho podría sugerir que BEDA es el responsable del efecto de recompensa generado por BZP a altas dosis, implicando que ocurrió el metabolismo de BZP a BEDA ya conocido. Además se observa que como aumenta la dosis de BEDA el efecto disminuye, esto puede deberse a un efecto tóxico del metabolito o incluso un fenómeno de tolerancia.

7.3. Evaluación sobre la Consolidación de la memoria

La evaluación de los fármacos testigos piracetam en el aumento de la consolidación de la memoria y escopolamina para el testigo del efecto amnésico se presentan en las Figuras 10A a 10C.

Como puede observarse en la Figura 10A, los entrenamientos realizados a los peces, tienen como consecuencia un proceso de aprendizaje que se ve reflejado en el aumento de la latencia que presenta cada pez en cada uno de los entrenamientos individuales. Al evaluar la consolidación de la memoria previa administración del fármaco se puede observar que en el caso de SSI el patrón de aumentar la latencia en cruzar al compartimiento 2 sigue aumentando sin llegar a tener diferencia estadísticamente significativa respecto al último entrenamiento, denominado E3.

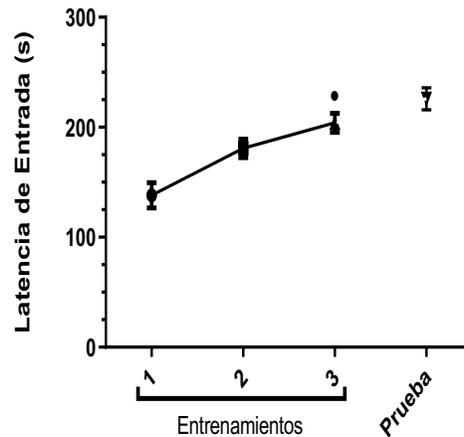


Figura 10A. Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para SSI

Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey.

• Se observa diferencia significativa respecto a E1 *Se observa diferencia significativa respecto a E3; $p < 0.05$; $n \geq 12$

Caso contrario a SSI, la escopolamina a dosis de 0.1 mg/kg, provoca que el pez presente amnesia, por lo que olvida lo que aprendió en el período de entrenamiento, disminuyendo de forma significativa ($p < 0.05$) la latencia en la prueba (Figura 10B) respecto al último entrenamiento realizado (E3), por lo que su consolidación de memoria disminuye. (19)

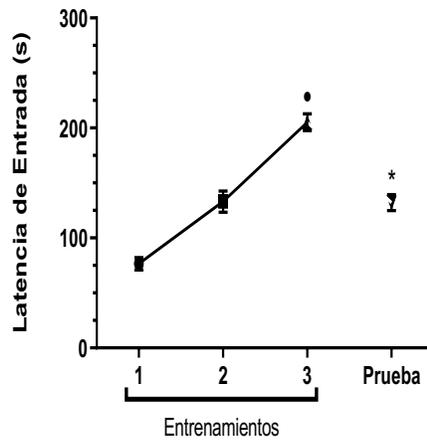


Figura 10B. Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para escopolamina 0.1 mg/kg. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey.
 •Se observa diferencia significativa respecto a E1 *Se observa diferencia significativa respecto a E3; $p < 0.05$; $n \geq 12$

En cambio para el caso de piracetam 10 mg/kg, la latencia aumenta significativamente ($p < 0.05$) respecto al último entrenamiento (E3), de forma tal que la consolidación de memoria se ve aumentada para este fármaco.(19)

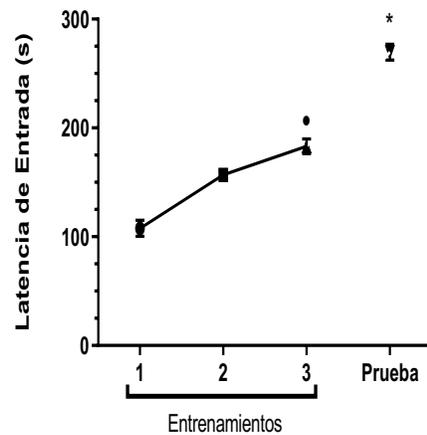


Figura 10C. Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para piracetam 10 mg/kg. Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey.
 •Se observa diferencia significativa respecto a E1 *Se observa diferencia significativa respecto a E3; $p < 0.05$; $n \geq 12$

En la Figura 11, se puede observar que BZP en las tres dosis evaluadas (1 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg) presenta un efecto en el aumento de la consolidación de la memoria, al aumentar significativamente ($p < 0.05$) la latencia de entrada respecto al último entrenamiento y en comparación al grupo control, donde este aumento no es significativo. (56)

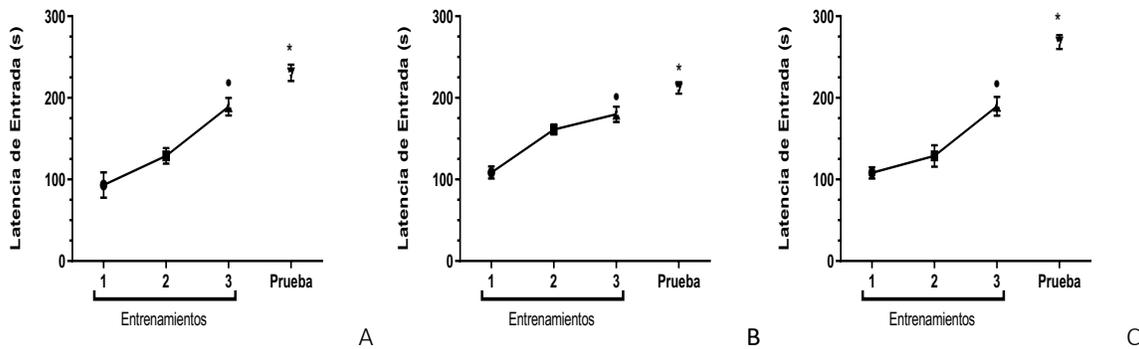


Figura 11. Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para BZP 1 mg/kg (A), BZP 30 mg/kg (B), BZP 100 mg/kg (C)

Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey.

• Se observa diferencia significativa respecto a E1 * Se observa diferencia significativa respecto E3; $p < 0.05$; $n \geq 8$

Para el caso de las tres dosis evaluadas de BEDA (1 mg/kg, 30 mg/kg y 100 mg/kg), no se modificó la latencia respecto al último entrenamiento (E3), comportándose de forma similar al grupo control tratado con SSI, lo que sugiere que no presenta efecto sobre la consolidación de la memoria. (Figura 12)

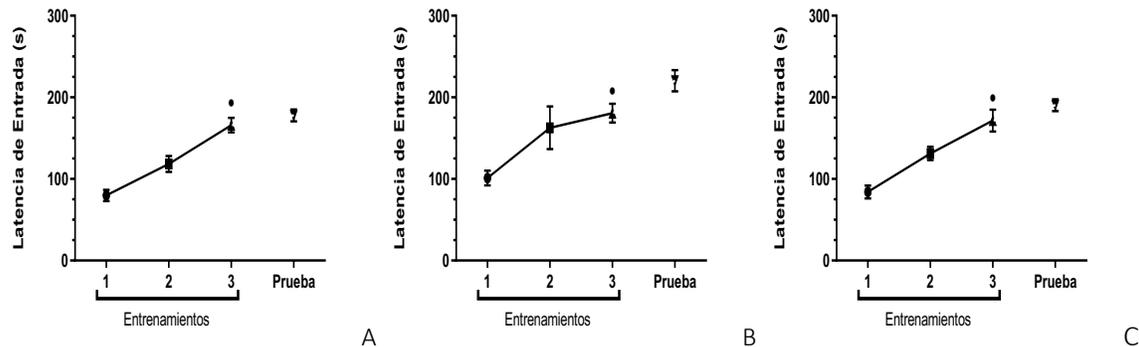


Figura 12. Curso temporal en la evaluación de consolidación de la memoria para BEDA 1 mg/kg (A), BEDA 30 mg/kg (B), BEDA 100 mg/kg (C)

Se presenta la media \pm EEM, se realizó una ANOVA de una vía seguida de una prueba *post-hoc* de Tukey.

• Se observa diferencia significativa respecto a E1 * Se observa diferencia significativa respecto E3; $p < 0.05$; $n \geq 8$

7.4. Determinación de la toxicidad aguda

En el caso de BZP, los resultados se ajustaron al algoritmo de Lorke(51), por lo que se emplearon las dosis sugeridas por el patrón de muerte presentado, evaluando las dosis de 140 mg/kg, 225 mg/kg, 370 mg/kg y 600 mg/kg; obteniendo la DL₅₀ mediante la media geométrica entre 370 mg/kg y 600 mg/kg, que fueron las dosis donde se presentó el 0% y el 100% de muerte respectivamente. La media geométrica entre estas dos dosis fue de 471 µg/g que corresponde a la DL₅₀ (Tabla 6). BEDA no se ajustó al algoritmo de Lorke(51), por lo que se evaluaron las dosis de 600 mg/kg, 1600 mg/kg y 2900 mg/kg en tres individuos cada dosis para posteriormente, calcular la DL₅₀ por medio de un análisis probit (57).

BZP (mg/kg)		BEDA (mg/kg)	
Primera Etapa	Segunda Etapa	Primera Etapa	Segunda Etapa
10 0/3*	140 0/1	10 0/3	600 1/3
100 0/3	225 0/1	100 1/3	1600 2/3
1000 3/3	370 0/1	1000 1/3	2900 3/3
	600 1/1		
DL ₅₀ BZP = 471.0 mg/kg		DL ₅₀ BEDA = 904.8 ± 373.1 mg/kg	

*Patrón de muerte de los animales (número de animales muertos/ número de animales empleados)

Tabla 6. Resultados de la estimación de la DL₅₀ para BZP y BEDA.

Lo anterior, sugiere que BZP tiene un potencial tóxico mayor que su metabolito BEDA, al presentar DL₅₀ de 471.0 mg/kg y 904.8 ± 373.1 mg/kg respectivamente. Esto puede explicarse debido a la apertura del anillo de BZP a BEDA en el metabolismo hepático de esta sustancia, además de que se ha descrito que las benzilpiperazinas presentan mayores efectos no deseados.(33)

7.5. Obtención del perfil de actividad biológica

Se obtuvo para BZP un perfil que consistió en 2163 actividades biológicas/acciones, en el caso de BEDA se obtuvo un perfil con 2183 actividades biológicas/acciones farmacológicas. Al filtrar los resultados para $P_a > 0.7$ se obtuvieron 10 y 32 actividades biológicas/acciones farmacológicas para BZP y BEDA respectivamente (Tabla 7 y 8).

Dentro de las actividades biológicas de BZP incluidas en el perfil con una $P_a=0.839$ se encuentra “*estimulante de la liberación de 5-HT*” que es concordante con la literatura y relacionado con la actividad biológica que se mostró en la consolidación de la memoria y efecto ansiogénico, sin embargo, esta actividad no está incluida para su metabolito BEDA, sin embargo, BEDA presentó con una $P_a=0.913$ la actividad de “*tratamiento de trastornos relacionados a fobias*”, que también está relacionada a los mecanismos y neurotransmisores asociados al efecto farmacológico de BEDA.(27)

<i>Actividad biológica/Acción farmacológica</i>	Pa	Pi
<i>Antagonista del receptor nicotínico alfa2beta2</i>	0.862	0.004
<i>Estimulante de la liberación de 5-Hidroxitriptamina</i>	0.839	0.010
<i>Antagonista del receptor nicotínico alfa2beta3beta4alfa5</i>	0.829	0.007
<i>Protector mucomembranoso</i>	0.817	0.014
<i>Tratamiento de desordenes fóbicos</i>	0.826	0.025
<i>Inhibidor de la testosterona 17beta deshidrogenasa</i>	0.778	0.031
<i>Inhibidor de la cloroperoxidasa</i>	0.749	0.006
<i>Inhibidor de la permeabilidad membranar</i>	0.742	0.023
<i>Inhibidor de la ATPasa transportadora de poliaminas</i>	0.715	0.011
<i>Inhibidor de la aspulvinona dimetilaliltransferasa</i>	0.751	0.048

Tabla 7. Perfil de Actividad Biológica para BZP con un filtro de $P_a > 0.7$

Actividad biológica/Acción Farmacológica	Pa	Pi
<i>Tratamiento de desordenes fóbicos</i>	0.913	0.004
<i>Inhibición de la superoxido dismutasa</i>	0.888	0.004
<i>Inhibidor de la ATPasa transportadora de poliaminas</i>	0.867	0.003
<i>Inhibidor de la fibrolasa</i>	0.845	0.003
<i>Inhibidor de la venombina AB</i>	0.82	0.005
<i>Inhibidor de la CDP-glicerol glicerofosfotransferasa</i>	0.829	0.024
<i>Inhibidor de la exoribonucleasa II</i>	0.796	0.008
<i>Inhibidor de la omptina</i>	0.792	0.008
<i>Inhibidor de la glucosa oxidasa</i>	0.795	0.013
<i>Inhibidor de la dimetilargininasa</i>	0.785	0.007
<i>Inhibidor pitrilisina</i>	0.781	0.007
<i>Inhibidor de la arginina 2-monooxigenasa</i>	0.784	0.01
<i>Inhibidor del factor de coagulación limulus B</i>	0.772	0.006
<i>Sustrato del CYP2D16</i>	0.756	0.004
<i>Inhibidor de la metilambeliferil-acetato desacetilasa</i>	0.745	0.006
<i>Inhibidor de la fusarinina-C ornitinerasa</i>	0.751	0.013
<i>Inhibidor del factor de coagulación limulus C</i>	0.74	0.008
<i>Activador de canal de calcio sensible a voltaje</i>	0.736	0.004
<i>Inhibidor de la enzima convertidora de pro-opiomelanocortina</i>	0.748	0.021
<i>Protector mucomembranoso</i>	0.754	0.033
<i>Agonista del factor estimulante de colonias de macrófago</i>	0.727	0.01
<i>Agonista del receptor GABA C</i>	0.713	0.003
<i>Inhibidor de la deshidrogenasa</i>	0.713	0.009
<i>Inhibidor de la treonin aldolasa</i>	0.711	0.009
<i>Inhibidor de la N-benziloxicarbonilglicina hidrolasa</i>	0.71	0.01
<i>Inhibidor del factor D del complemento</i>	0.716	0.016
<i>Inhibidor de la metilentetrafolato reductasa</i>	0.721	0.028
<i>Inhibidor de la pseudolisina</i>	0.708	0.018
<i>Agonista de la integridad membranal</i>	0.737	0.048
<i>Antagonista del receptor nicotínico alfa6beta3beta4alfa5</i>	0.704	0.033
<i>Agonita del receptor de imidazolina</i>	0.67	0.004
<i>Antiseborreico</i>	0.702	0.037

Tabla 8. Perfil de Actividad Biológica para BEDA con un filtro de Pa>0.7

8. Discusión

Los resultados obtenidos a partir de la evaluación del posible efecto ansiogénico en la prueba de claro/oscuro en *D. rerio* dan evidencia aun efecto de tipo ansiogénico tanto para BZP como para BEDA, de acuerdo a lo descrito por el etograma característico de este efecto (Tabla 4).

El efecto se presentó en todos los parámetros evaluados a excepción de la latencia (Figura 8C), ya que el comportamiento clásico es un aumento en el tiempo que el pez tarda en cruzar del espacio oscuro al espacio blanco y en la evaluación realizada se presentó el caso contrario. Dicha tendencia se explica por la misma ansiedad generada por el compuesto, ya que desde un punto de vista experimental los animales cruzaban a la parte blanca mediante un nado errático y retornaban al espacio oscuro rápidamente. Lo anterior puede verse reflejado en el tiempo de scototaxia presentado y el número de nados erráticos (Figura 8A y Figura 8E). Además se ha reportado que el comportamiento de los peces en la evaluación de este parámetro puede tener ligeras variaciones por el estado del pez y su procedencia. (44)

Con base en los resultados y de acuerdo a las observaciones experimentales que surgieron durante la realización de los experimentos, se sugiere una priorización de los parámetros a incluir dentro del etograma para la evaluación del efecto ansiogénico eligiendo aquellos que se mostraron fenotípicamente más robustos en esta prueba empleando pez cebra, como lo son la scototaxia, número de nados erráticos y número de entradas al espacio blanco.

Para la evaluación del efecto de recompensa de BZP se observó que el porcentaje del cambio de sitio de preferencia condicionado (%CSPC) cambió de forma creciente en relación con la dosis, por lo tanto se sugiere que BZP genera un efecto sobre la recompensa de acuerdo a los resultados obtenidos. Este efecto asociado a BZP ya se ha descrito(21)(33). Lo anterior permite validar la metodología para la evaluación del efecto sobre la recompensa usando pez cebra.

En el caso del metabolito BEDA, se presentó un cambio en el efecto sobre la recompensa respecto a BZP al comportarse de tipo dosis-dependiente de forma decreciente, atribuyéndose este cambio en el perfil adictivo al cambio en la estructura de BZP a BEDA, ya que BEDA no presenta el anillo de piperazina.

El hecho de que BEDA presentará un decremento del % CSPC con el aumento de la dosis puede sugerir un efecto tóxico o de tolerancia, por lo que adicional a los estudios de toxicidad la DL_{50} para BZP fue menor ($DL_{50} = 471.0 \text{ mg/kg}$) que la obtenida para BEDA ($DL_{50} = 904.8 \pm 373.1 \text{ mg/kg}$), por lo que se considera que BEDA tiene un potencial tóxico menor que BZP al requerir una dosis mayor para ser letal en el 50% de la población en estudio.

De acuerdo a lo anterior la toxicidad fue descartada de ser la responsable del comportamiento de BEDA en la evaluación del efecto sobre la recompensa suponiendo un posible efecto de tolerancia debido a que conforme se aumentó la dosis de BEDA la respuesta disminuyó después de las administraciones del fármaco. (58)

El efecto sobre la consolidación de la memoria evaluado por la prueba de evitación pasiva en pez cebra solo se presentó en BZP a las tres dosis evaluadas y para BEDA no se presentó efecto a ninguna dosis. Esto concuerda con el aumento en la consolidación de la memoria para BZP reportado en modelos murinos por Castillo y colaboradores. (24)

En el caso de BEDA existe discrepancia entre el estudio realizado en este trabajo empleando *Danio rerio* y el estudio en un modelo murino realizado por Castillo y colaboradores. Esto debido a que el presente trabajo sugiere que este compuesto no presenta efecto sobre la consolidación de la memoria y el estudio antecedente en murinos señala que BEDA produce un aumento en la consolidación de la memoria. (24)

Este último comportamiento puede explicarse a variaciones sistemáticas del protocolo experimental en la evaluación realizada por Castillo et al, mismas que pueden interpretarse de forma errónea. Se considera que dichas variaciones son muy frecuentes en roedores y son consecuencia de la habituación que experimentan los animales durante el desarrollo de este tipo de determinaciones. (18)

Al analizar el perfil de actividad de BZP y BEDA empleando un filtro de $P_a > 0.7$, se obtuvo una probabilidad de actividad serotoninérgica de 0.839 para BZP, siendo concordante con lo que ya se ha reportado anteriormente para BZP.(27)

En el caso de BEDA, no se estableció la actividad serotoninérgica dentro de las probabilidades para esta molécula, es decir que el software no reconoció la estructura de BEDA como una molécula que posea actividad serotoninérgica, lo que se debe a que el alcance del software no incluye moléculas que compartan esta actividad ni similitudes estructurales con BEDA.

Sin embargo, es interesante que de acuerdo a la predicción computacional la actividad como tratamiento de desórdenes fóbicos presenta una alta probabilidad ($P_a = 0.913$), cuando contrariamente se ha descrito en estudios previos y en el presente trabajo que BEDA es una molécula que genera ansiedad, que es uno de los signos típicos presentes en este tipo de trastornos. (38)

Retomando lo anterior y vinculando el hecho de que en la consolidación de la memoria una de las vías involucradas es el incremento de la actividad serotoninérgica, además de que el perfil de actividad para las moléculas establezca una probabilidad alta en la actividad serotoninérgica para BZP y no establezca una probabilidad alta de actividad para BEDA, los resultados experimentales alrededor de la actividad de 5-HT en la consolidación de la memoria y el perfil de actividad biológica son concordantes entre sí. (28)(29)(30)

En cuanto al efecto ansiogénico y el efecto de recompensa, también la actividad serotoninérgica, ha sido descrita previamente como la responsable de la actividad farmacológica de BZP y BEDA. (27)

Sin embargo, los estudios computacionales solo sugieren un incremento de la actividad serotoninérgica para BZP. Lo anterior, es concordante para el efecto de recompensa y la ansiogénesis que presentó BZP en el presente trabajo.

La diferencia estructural entre BZP y su metabolito BEDA, consiste en la apertura del anillo de piperazina en BZP a una cadena de etilendiamina, esta modificación generará una diferencia en la actividad neurofarmacológica de estos dos compuestos evaluada en *Danio rerio*, coincidiendo únicamente en la actividad ansiogénica al evaluarse en un modelo de claro/oscuro.

Sin embargo el metabolismo de BZP a BEDA generará una pérdida de actividad ya que BEDA en cuanto a la consolidación de la memoria y efecto de recompensa no presentó actividad, además presentó una DL_{50} mayor que BZP.

9. Conclusión.

Se establecieron los métodos experimentales en *Danio rerio* que permitieron evaluar la neurofarmacología *N*-bencilpiperazina (BZP) y *N*-benciletilendiamina (BEDA), mismos que dan evidencia del efecto ansiogénico, efecto sobre la recompensa y efecto sobre la consolidación de la memoria, obteniendo que ambas moléculas presentaron actividad ansiogénica, sin embargo solo *BZP* presentó efecto de recompensa y aumento de la consolidación de la memoria.

Las metodologías establecidas permitiran la evaluación de la ansiedad, efecto sobre la consolidación de la memoria, efecto sobre la recompensa y determinación de la DL_{50} empleando pez cebra, de sustancias que potencialmente puedan actuar a nivel de Sistema Nervioso Central.

10. Referencias

1. Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496(7446):498–503.
2. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet*. 2007;8(5):353–67.
3. Kalueff A V., Echevarria DJ, Stewart AM. Gaining translational momentum: More zebrafish models for neuroscience research. Vol. 55, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2014. p. 1–6.
4. Bilotta J, Saszik S, Delorenzo AS, Hardesty HR. Establishing and maintaining a low-cost zebrafish breeding and behavioral research facility. *Behav Res Methods, Instruments, Comput*. 1999;31(1):178–84.
5. Stewart A, Wong K, Cachat J, Gaikwad S, Kyzar E, Wu N, et al. Zebrafish models to study drug abuse-related phenotypes. *Rev Neurosci*. 2011;22(1):95–105.
6. da Silva Aleluia GA, Keita H, da Silva HR, Balderas JL, Cruz RAS, dos Santos Sampaio TI, et al. Leaves of *Spondias mombin* L. a traditional anxiolytic and antidepressant: Pharmacological evaluation on zebrafish (*Danio rerio*). *J Ethnopharmacol*. 2018;224(April):563–78.
7. Graeff FG. Anxiety , panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis Ansiedade , pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. 2007;(55 16):3–6.
8. Hila;-Dandam B. Goodman & Gilman Manual de Farmacología y Terapéutica. Mc Graw Hill

9. Rang, Dale, Ritter F. Rang & Dale Farmacología. 8va ed. Elsevier; 2016.
10. Brunette MF, Noordsy DL, Xie H, Drake RE. Benzodiazepine Use and Abuse Among Patients With Severe Mental Illness and Co-occurring Substance Use Disorders. *Psychiatr Serv.* 2003;54(10):1395–401.
11. Arias-carrión O, Stamelou M, Murillo-rodríguez E, Menéndez-gonzález M, Pöppel E. Dopaminergic reward system : a short integrative review. 2010;1–6.
12. Silbergeld EK, Holmberg B, Högberg J. Principios Generales de Toxicología. Vol. 69.
13. Juárez FJ, Sánchez ARR, Río FAP del. Toxicología Básica.
14. Andel ERICRK. Toward a molecular definition of long-term memory storage. 1996;93(November):13445–52.
15. Polster MR, Schacter DL. Cognitive Neuroscience Analyses of Memory : A H i s t o r i c Perspective. 3(2).
16. Cammarota M, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Ramirez M, Medina JH, Izquierdo I. Relationship between short- and long-term memory and short- and long-term extinction. *Neurobiol Learn Mem.* 2005;84(1):25–32.
17. Navarrete A, Flores-Machorro FX, Téllez-Ballesteros RI, Alfaro-Romero A, Balderas JL, Reyes A. Study on action mechanism of 1-(4-methoxy-2-methylphenyl)piperazine (MMPP) in acquisition, formation, and consolidation of memory in mice. *Drug Dev Res.* 2014;75(2):59–67.

18. Grossman L, Stewart A, Gaikwad S, Utterback E, Wu N, Dileo J, et al. Effects of piracetam on behavior and memory in adult zebrafish. *Brain Res Bull* [Internet]. 2011;85(1–2):58–63.
19. Kim YH, Lee Y, Kim D, Jung MW, Lee CJ. Scopolamine-induced learning impairment reversed by physostigmine in zebrafish. *Neurosci Res* . 2010;67(2):156–61.
20. Monteiro MS, Bastos MDL, Guedes De Pinho P, Carvalho M. Update on 1-benzylpiperazine (BZP) party pills. *Arch Toxicol*. 2013;87(6):929–47.
21. Cohen BMZ, Butler R. BZP-party pills: A review of research on benzylpiperazine as a recreational drug. *Int J Drug Policy*. 2011;22(2):95–101.
22. Secretaría de Salud. DECRETO por el que se reforman las fracciones I y III del artículo 245 de la Ley General de Salud. (DOF 07-01-2014). 2014;
23. Inoue H, Katagi M, Tsuchihashi H, Nakajima K, Tsutsumi H, Miki A, et al. Metabolism and the Urinary Excretion Profile of the Recently Scheduled Designer Drug N-Benzylpiperazine (BZP) in the Rat. *J Anal Toxicol*. 2013;30(1):38–43.
24. Castillo-Hernández JC, Velázquez-Moyado JA, Reyes-Ramírez A, Ramírez-López EG, González-Andrade M, Navarrete A. Effect of N-Benzylpiperazine, Its Metabolite N-Benzylethylenediamine, and Its Disubstituted Analogue N, N'-Dibenzylpiperazine on the Acquisition, Formation, and Consolidation of Memory in Mice. *Pharmacology*. 2017;99(5–6):268–74.
25. Springer D, Peter F, Fritschi G. Studies on the metabolism and toxicological detection of the new designer drug 4'-methyl-alpha-pyrrolidinopropiophenone in urine using gas chromatography mass spectrometry. *JChromatogrB*. 2002;773(1):25- 33.

26. Fernández, A. G., de Sande García, M. A., Fernández, A. M. M., Ramos, S. B. & G. Aspectos fundamentales del Citocromo P450. 2011.
27. Iversen, White, Treble. Designer psychostimulants: Pharmacology and differences [Internet]. Neuropharmacology. 2014.
28. Dukat M, Abdel-Rahman AA, Ismaiel AM, Ingher S, Teitler M, Gyermek L, et al. Structure-activity relationships for the binding of arylpiperazines and arylbiguanides at 5-HT₃ serotonin receptors. *J Med Chem*. 1996;39(20):4017–26.
29. Meneses A, Hong E. Role of 5-HT(1B), 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptors in learning. *Behav Brain Res*. 1997;87(1):105–10.
30. Baumann MH, Clark RD, Budzynski AG, Partilla JS, Blough BE, Rothman RB. N-substituted piperazines abused by humans mimic the molecular mechanism of 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, or 'Ecstasy'). *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(3):550–60.
31. Bye C, Munro-Faure AD, Peck AW, Young PA. A comparison of the effects of 1-benzylpiperazine and dexamphetamine on human performance tests. *Eur J Clin Pharmacol*. 1973;6(3):163–9.
32. D.M. W, J. B, S. L, J. R, D.W. H, P.I. D. Dissociative and sympathomimetic toxicity associated with recreational use of 1-(3-trifluoromethylphenyl) piperazine (TFMPP) and 1-benzylpiperzine (BZP). *J Med Toxicol* [Internet]. 2008;4(4):254–7.
33. Barone JA, Shermock KM. Piperazine designer drugs of abuse. *J Pharm Pract*. 2007;10(4):292–300.

34. Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M. Serotonin Receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications. 2011;1(Peroutka 1984):15–25.
35. Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. 1999;38:1083–152.
36. Kroeze WK, Kristiansen K, Roth BL. Molecular Biology of Serotonin Receptors – Structure and Function at the Molecular Level. 2002;507–28.
37. Central N. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. 2000;11(1):39–60.
38. Vaughan RA, Foster JD. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. 2013;34(9):489–96.
39. Lagunin A, Filimonov D, Poroikov V. Multi-Targeted Natural Products Evaluation Based on Biological Activity Prediction with PASS. 2010;1703–17.
40. Anzali S, Barnickel G, Cezanne B, Krug M, Filimonov D, Poroikov V. Discriminating between Drugs and Nondrugs by Prediction of Activity Spectra for Substances (PASS). 2001;2432–7.
41. Buck JS, Lorz E, Schön W. The Preparation of Some Substituted Piperazines. 1944;39(1):1–4.

42. Stewart, A., Cachat, J. M., Suci, C., Hart, P. C., Gaikwad, S., Utterback, E., ... & Kalueff, A. V. (2011). Intraperitoneal injection as a method of psychotropic drug delivery in adult zebrafish. In *Zebrafish neurobehavioral protocols* (pp. 169-179). Huma. Springer protocols 2011 p. 169–80.
43. Kinkel MD, Eames SC, Philipson LH, Prince VE. Intraperitoneal Injection into Adult Zebrafish. *J Vis Exp*. 2010;(42):3–6.
44. Herculano AM, Morato S, da Silva Batista AW, Gouveia A, de Brito TM, Maximino C. Measuring anxiety in zebrafish: A critical review. *Behav Brain Res*. 2010;214(2):157–71.
45. Egan RJ, Bergner CL, Hart PC, Cachat JM, Canavello PR, Elegante MF, et al. Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. 2009;205:38–44.
46. Maximino C, de Brito TM, Colmanetti R, Pontes AAA, de Castro HM, de Lacerda RIT, et al. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. *Behav Brain Res*. 2010;210(1):1–7.
47. Maximino C, da Silva AWB, Gouveia A, Herculano AM. Pharmacological analysis of zebrafish (*Danio rerio*) scototaxis. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry*. 2011;35(2):624–31.
48. Maximino C, Marques De Brito T, De Mattos Dias CAG, Gouveia A, Morato S. Scototaxis as anxiety-like behavior in fish. *Nat Protoc*. 2010;5(2):221–8.
49. Ninkovic J, Bally-Cuif L. The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*. 2006;39(3):262–74.

50. A.D. C, K.M. K, E.M. C, R.S. M, D.J. E. Zebrafish and conditioned place preference: A translational model of drug reward. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* . 2014;55:16–25.
51. Lorke D. A new approach to acute toxicity testing. *Arch Toxicol*. 1983;54:275–87.
52. Ag B. LD50 Versus Acute Toxicity. 2000;(1982):183–6.
53. Poroikov V. BIOINFORMATICS APPLICATIONS NOTE PASS : prediction of activity spectra for. 2000;16(8):747–8.
54. Filimonov D, Poroikov V, Borodina Y, Glorizova T. Chemical Similarity Assessment through Multilevel Neighborhoods of Atoms : Definition and Comparison with the Other Descriptors. 1999;666–70.
55. Bailey JM, Oliveri AN, Levin ED. *Pharmacology , Biochemistry and Behavior* Pharmacological analyses of learning and memory in zebra fi sh (*Danio rerio*). *Pharmacol Biochem Behav* 2015;139:103–11.
56. Choi Y, Lee C, Kim Y. MK-801-induced learning impairments reversed by physostigmine and nicotine in zebrafish. 2011;15(2).
57. Lower CL, Upper CL. Procedure 9 Quantal Dose-Response : Probits The quantal , or all-or-none , dose-response relation is obtained by specifying a. 1987;31–4.
58. (19 SS. Classical Conditioning, Drug Tolerance, and Drug Dependence. *Drug Depend Res Adv Alcohol Drug Probl*. 1983;7.