



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza
Carrera de Química Farmacéutico Biológica

Evaluación del efecto nootrópico de nuevos
compuestos híbridos de antagonistas del receptor
sigma-1 e inhibidores de acetilcolinesterasa

Tesis

Para obtener el título de:

Licenciado en Química Farmacéutica Biológica

Presenta:

Bautista Garcia Luis Fernando

Jurado de Examen

Directora: Dra. Myrna Déciga Campos

Asesora: Mtra. Leticia Huerta Flores

Asesora: QFB. Rocío Ramírez Hernández

Sinodal: Mtra. Teresa Benítez Escamilla

Sinodal: QFB. Lidia Sánchez Ortiz

Ciudad de México

2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente estudio fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Myrna Déciga Campos, adscrita a la sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. El financiamiento fue otorgado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN en los proyectos SIP-20210049 y SIP-20220300.

Luis Fernando Bautista García. Determinación del efecto de donepezilo en un modelo de cognición de *Danio rerio*, presentado en el foro XVII PIFI del IPN en CDMX del 17 al 20 de octubre de 2022.

Índice de contenido

I	Resumen	6
II	Introducción	7
III	Marco teórico.....	9
	3.1 Definición de memoria	9
	3.2 Proceso fisiológico de la memoria	9
	3.3 Somatostatina en el hipocampo	13
	3.4 Efecto nootrópico	14
	3.5 Receptor sigma-1 (σ_1)	15
	3.6 Inhibidores de acetilcolinesterasa	16
	3.7 Diseño de compuestos híbridos de antagonistas del receptor sigma-1 e inhibidores de acetilcolinesterasa	17
	3.8 Mecanismos moleculares de la pérdida de cognición.....	19
	3.9 Epidemiología de alzheimer	20
	3.10 Modelos experimentales para evaluar la cognición	21
	3.11 <i>Danio rerio</i> como modelo experimental de cognición	23
	3.11.1 Reproducción	23
	3.11.2 Importancia como modelo de estudio	24
IV	Planteamiento del problema	25
V	Pregunta de investigación	27
VI	Objetivos	27
	6.1 General	27
	6.2 Específicos.....	27
VII	Método	28
	7.1 Universo.....	28
	7.2 Materiales y reactivos	28

7.3	Variables.....	28
7.4	Hipótesis.....	28
7.5	Diseño de estudio.....	29
7.6	Procedimiento.....	30
7.7	Análisis estadístico.....	31
VIII	Resultados.....	32
8.1	Comportamiento de <i>Danio rerio</i> en condición normal y habituación.....	32
8.2	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en un cilindro con escopolamina..	32
8.3	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en donepezilo.....	34
8.4	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en haloperidol.....	34
8.5	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en LMH-2.....	35
8.6	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en la serie ROE (ROE-1 – ROE-14)	36
8.6.1	Compuestos híbridos de la serie ROE parecidos a donepezilo.....	36
8.6.2	Compuestos híbridos de la serie ROE parecidos haloperidol.....	38
8.6.3	Compuestos híbridos de la serie ROE con actividad inespecífica.....	39
IX	Discusión.....	43
9.1	Comportamiento de <i>Danio rerio</i> en condición normal y habituación.....	43
9.2	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en un cilindro con escopolamina..	44
9.3	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en donepezilo.....	45
9.4	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en haloperidol.....	46
9.5	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en LMH-2.....	47
9.6	Efecto de la inmersión de <i>Danio rerio</i> en la serie ROE (ROE-1 – ROE-14)	47
X	Conclusión.....	48

Índice de Figuras

Figura 1. Flujo de información hasta la consolidación de la memoria	9
Figura 2. Potenciación a largo plazo	12
Figura 3. Receptores ionotrópicos	12
Figura 4. Principales síntomas de la pérdida de memoria	21
Figura 5. Pez cebra	23
Figura 6. Peceras utilizadas en el modelo de cognición.....	31
Figura 7. Conducta normal y con habituación del pez cebra en un cilindro de exploración.	33
Figura 8. Curso temporal de la conducta normal, habituación y escopolamina de <i>Danio rerio</i> en un cilindro de exploración.	33
Figura 9. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y diferentes fármacos.	34
Figura 10. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y diferentes fármacos.....	35
Figura 11. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y diferentes compuestos.	35
Figura 12. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y serie ROE con actividad nootrópica	38
Figura 13. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y serie ROE con actividad semejante al haloperidol.	39
Figura 14. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y serie ROE con actividad inespecífica.....	42

Índice de tablas

Tabla 1. Áreas específicas que participan en la cognición	10
Tabla 2. Estructuras base y compuestos híbridos.....	18

I Resumen

El presente trabajo tiene la finalidad de aportar evidencias farmacológicas en el estudio de nuevos compuestos híbridos (ROE-1-ROE-14) que actúan principalmente sobre receptores sigma-1 e inhibidores de acetilcolinesterasa que se relacionan con el accionar de la memoria del ser humano. De esta forma se pretende que funcionen como alternativa a los fármacos contra la demencia provocada principalmente por el Alzheimer.

El estudio de análisis se realizó mediante la implementación de un modelo nuevo basado en el reconocimiento de nuevos objetos. Para ello se utilizaron peces cebra debido a su similitud fisiológica con el ser humano. El modelo consistió en generar una habituación de memoria en los animales mediante un entrenamiento en una pecera luz/oscuridad empleando un estímulo de ruido mecánico. Se utilizó escopolamina para inducir la pérdida de memoria.

Posteriormente, se sometió al pez cebra a una pecera cilíndrica para reconocimiento de un espacio nuevo. La pecera se dividió en dos segmentos para evaluar la movilidad del pez, contando el tiempo de permanencia en la parte superior con respecto a la inferior. Grupos de peces cebra fueron expuestos a la serie de compuestos ROE-1 – ROE-14 durante 24 horas previas a la exposición de escopolamina y la conducta del tiempo de permanencia en la parte superior del cilindro de estos peces fue comparado con respecto a los compuestos de referencia como el donepezilo, LMH-2 y haloperidol.

Los resultados obtenidos sugieren que los compuestos ROE-2, ROE-4, ROE-5 y ROE-7 podrían tener utilidad terapéutica para el tratamiento de desórdenes cognitivos, por lo que el presente estudio de crecimiento farmacológico permite sugerir que éstos compuestos pueden ser evaluados en una especie superior como roedores.

II Introducción

En la actualidad las enfermedades neurodegenerativas son de gran importancia ya que a nivel mundial se han convertido en las principales causas de morbilidad y mortalidad. Estas se caracterizan por ser trastornos hereditarios esporádicos del sistema nervioso central (SNC), que generan una pérdida de función lenta y progresiva en poblaciones neuronales, así como en sus conexiones.

Las enfermedades neurodegenerativas se pueden clasificar en función de las características clínicas primarias (Parkinson, demencia o enfermedad motoneurona), de acuerdo con la distribución anatómica de la neurodegeneración (degeneraciones frontotemporales, trastornos extrapiramidales o espinocerebelosas) o anomalías moleculares principales.

Dentro de las enfermedades neurodegenerativas se encuentra la demencia que se caracteriza por generar el deterioro progresivo de las capacidades cognitivas, la cual puede ser provocada por Alzheimer convirtiéndose en una de las principales causas con alrededor del 60 al 80 % de los casos.

En el presente, para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas se utilizan principalmente 4 fármacos tales como donepezilo, rivastigmina, galantamina y tacrina, los cuales se caracterizan por ser antagonistas reversibles de las colinesterasas, enzimas que reducen la neurotransmisión colinérgica al neutralizar la separación de la acetilcolina en la sinapsis, en sus dos elementos acetato y colina.

Estos fármacos se consideran la primera línea contra deficiencias cognitivas que van desde leve a moderado, además, son considerados tolerables para los pacientes. Sin embargo, se suelen presentar efectos adversos comúnmente como molestias en el tubo digestivo, molestias musculares y trastornos del sueño.

La última relación de los efectos adversos con la primera línea de fármacos contra enfermedades neurodegenerativas ha generado dudas en cuanto a su eficacia, por lo cual se ha requerido generar nuevas propuestas de investigación. En este sentido

en el presente proyecto se evaluarán 12 compuestos de la serie ROE (ROE 1-14) con posible actividad nootrópico por medio de un modelo experimental de *Danio rerio*.

III Marco teórico

3.1 Definición de memoria

La memoria se define como una capacidad excepcional donde el cerebro modifica y reorganiza los aprendizajes, así como las interacciones con el mundo exterior, lo que permite un cambio constante para posteriormente establecer lo que se puede percibir, recordar y comprender (Thompson, 2013).

Existen diferentes tipos de memoria en los que se puede distinguir la memoria declarativa (explícita) y memoria no declarativa (implícita) (Connors, 2016).

La memoria declarativa se caracteriza por ser aquella que se basa en hechos y acontecimientos mientras que la no declarativa se encarga de las habilidades, hábitos y comportamientos (Connors, 2016).

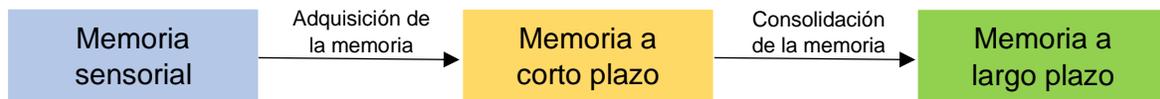


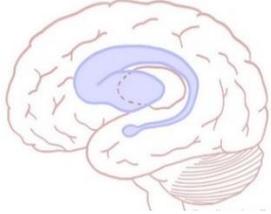
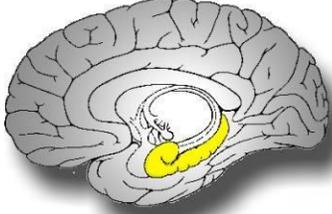
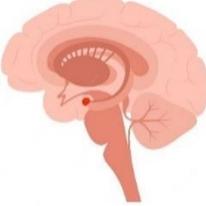
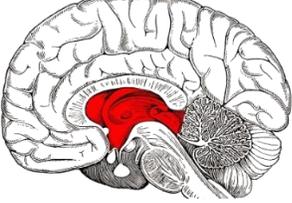
Figura 1. Flujo de información hasta la consolidación de la memoria (Connors, 2016).

3.2 Proceso fisiológico de la memoria

La zona del cerebro en donde se procesa la información sensitiva es la corteza cerebral, ahí llega la información que se relaciona con el estado emocional y se guarda como memoria. Hay tres estructuras importantes que controlan el proceso de la memoria dentro de los hemisferios cerebrales: los ganglios basales, el hipocampo y el núcleo amigdalino. En grupo estas estructuras son las encargadas de la formación de recuerdos a largo plazo relacionados con vivencias diarias (Kandel, 2011).

Varias estructuras del cerebro participan en el procesamiento de la memoria (tabla 1).

Tabla 1. Áreas específicas que participan en la cognición (Kandel, 2011).

Estructura	Relación con la memoria
 <p data-bbox="418 579 667 615">Ganglios basales</p>	<p data-bbox="878 436 1377 575">Participan en distintas formas de cognición tales como el aprendizaje de habilidades</p>
 <p data-bbox="461 905 623 940">Hipocampo</p>	<p data-bbox="894 747 1365 886">Es el encargado de crear recuerdos a largo plazo sobre las vivencias del día con día</p>
 <p data-bbox="477 1199 613 1234">Amígdala</p>	<p data-bbox="878 1020 1377 1213">Participa en la coordinación de distintas estructuras cerebrales con la finalidad de generar una respuesta apropiada</p>
 <p data-bbox="488 1482 597 1518">Tálamo</p>	<p data-bbox="889 1367 1365 1505">Funciona para clasificar la información que llega a la corteza cerebral</p>
 <p data-bbox="423 1797 662 1833">Corteza cerebral</p>	<p data-bbox="889 1650 1365 1789">Se encarga del procesamiento de la información para generar distintas acciones específicas</p>

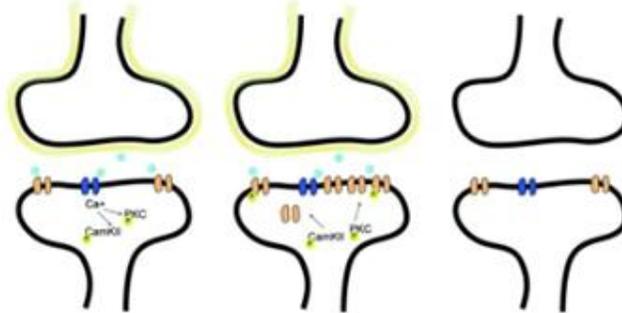
La plasticidad a largo plazo (PLP) es un modelo de red neuronal que sirve para explicar cómo al aumentar o disminuir la fuerza de la actividad sináptica es importante para que se genere una actividad selectiva neuronal y se guarde información, particularmente en el hipocampo, una región caracterizada por la formación de memoria (Connors, 2016).

La PLP se caracteriza por ser similar a un aumento en la fuerza sináptica posterior a la estimulación de alta frecuencia de la neurona presináptica. La forma común de PLP es dependiente del receptor N-metil D-aspartato (NMDA). En presencia de una excitación alta, el neurotransmisor glutamato se libera de la neurona presináptica y se une a la neurona postsináptica a través de los receptores ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico AMPA, los cuales despolarizan la neurona, por lo cual se abre el canal del receptor NMDA. El canal abierto permite la entrada de iones calcio, lo que conduce a una cascada de fosforilación CaMKII y PKC se encarga de fosforilar receptores AMPA, por lo cual se aumenta la conductancia de los receptores involucrados y permite la inserción por parte de los receptores AMPA. Es importante señalar que estos eventos no involucran síntesis de proteínas y da como resultado una potenciación a corto plazo (LTP). Sin embargo, el PLP tardío requiere la transcripción de proteínas y genes en la célula postsináptica (Axmacher, 2017)

El PLP tardío solo ocurre cuando la estimulación de la neurona presináptica es lo suficientemente fuerte. Se requieren distintas moléculas citoplásmicas y nucleares para de esta forma generar la síntesis de proteínas y los cambios morfológicos pertenecientes al PLP tardío. Entre los factores a destacar es el encargado de la transcripción (CREB). Todos los factores juntos provocan una serie de cascadas que permiten estabilizar nuevos receptores por parte de AMPA localizados en la membrana celular y generar una potenciación duradera. Es importante resaltar que el PLP dependiente del receptor NMDA tiene una gran relevancia, ya que su inhibición genera la reducción de LTP en el hipocampo, lo cual provoca un déficit en la memoria (Axmacher, 2017).

a) Estimulación débil que conduce a LTP temprana

● Glutamato
 ● NMDA
 ● AMPA



b) Fuerte estimulación que conduce a LTP temprana

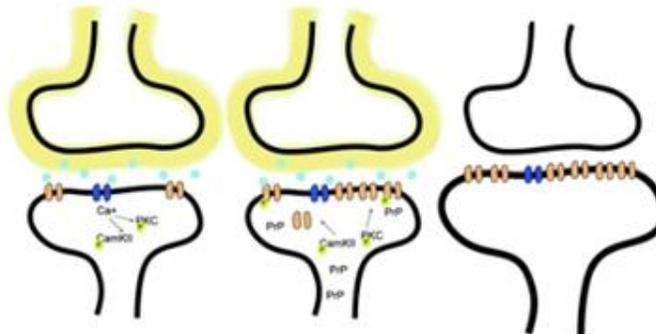


Figura 2. Potenciación a largo plazo (Axmacher, 2017).

El glutamato (Glu) se considera un neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso. El Glu se caracteriza por la unión a un receptor específico (GluR) además permite la neurotransmisión excitatoria y la transducción de señales intracelulares. Los receptores para Glu se clasifican principalmente en: ionotrópicos y metabotrópicos de acuerdo con su rapidez de neurotransmisión y mecanismos de señalización. Los receptores ionotrópicos (iGluR) se clasifican principalmente en tres subtipos: canales AMPA, kainato y NMDA (Figura 3) (Hashimoto, 2017).

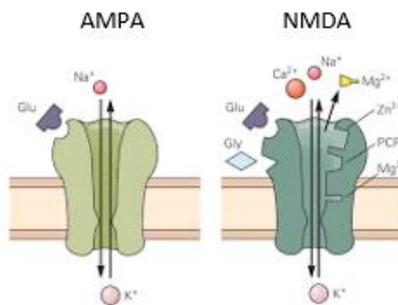


Figura 3. Receptores ionotrópicos (Hashimoto, 2017).

Los receptores NMDA se caracterizan por ser canales de cationes no selectivos donde fluye principalmente Ca^{2+} y son inhibidos por el magnesio extracelular, lo que genera una sensibilidad al voltaje extrínseco. Otra característica importante para resaltar es la larga duración por parte de la respuesta sináptica que genera posterior a la unión del neurotransmisor. Los receptores NMDA son proteínas multiméricas y sus subunidades le permiten obtener propiedades farmacológicas, cinéticas y de activación. Es importante resaltar que los antagonistas del receptor NMDA han funcionado para el tratamiento del alzheimer (Tovar, 2016).

Una de las principales funciones a destacar por parte de los receptores NMDA es la activación de la subunidad NMDAR que actúa en el aprendizaje y la memoria. El hipocampo toma gran relevancia en las últimas dos funciones mencionadas. Un cambio y mantenimiento por parte de la eficacia en la transmisión sináptica son esenciales para la plasticidad sináptica, que es parte fundamental para generar una base fisiológica en el almacenamiento de información dentro del cerebro. Un modo de plasticidad sináptica es aumentar la transmisión sináptica mejor conocida como potenciación a largo plazo (LTP). El deterioro de LTP disminuye directamente la memoria (Hashimoto, 2017).

3.3 Somatostatina en el hipocampo

La somatostatina (SOM) es un péptido, también llamado factor inhibidor de la liberación de somatotropina (SRIF), el cual se encontró originalmente en el hipotálamo. Se encuentra en la corteza cerebral, almacenada en vesículas localizadas en el núcleo denso de un subconjunto característico de interneuronas gabaérgicas y se libera con una intensa actividad neuronal (Honoré, 2021).

Es importante resaltar que las interneuronas se relacionan con SOM mediante acciones gabaérgicas que generan una inhibición local que regula las redes del hipocampo e inhibe a distancia para armonizar las tareas del hipocampo con otras áreas (Honoré, 2021).

El SOM se caracteriza por unirse principalmente a cinco receptores metabotrópicos (SST R 1-5) los cuales se acoplan a la proteína G. Debido a la distribución de SSTR se ha sugerido que regulan las redes del hipocampo por medio de SOM, sin

embargo, los mecanismos por los que este péptido normaliza el hipocampo aún continúan siendo ambiguos. Los reportes generados en cuanto al efecto de membrana y sinápticos son distintos y en ocasiones se contradicen, ya que por un lado algunos mencionan que SOM mantiene un efecto de inhibir las neuronas piramidales que generan un efecto hiperpolarizante, por lo cual se reduce la actividad espontánea y recordar, disminuyendo consistentemente la corriente de NMDA y AMPA (Honoré, 2021).

SOM ha funcionado como neuromodulador en el hipocampo también se han encontrado efectos ansiolíticos y antidepresivos mediante la supresión del eje hipotálamo-pituitario-suprarrenal, gracias a este mecanismo se ha encontrado que SOM está relacionada con la regularización de las emociones y las respuestas al estrés que regulan la memoria y el aprendizaje (Honoré, 2021).

En un nivel conductual, la disminución dendrítica regulada por las interneuronas SOM es importante en la memoria y el aprendizaje dependientes del hipocampo. La inactivación de las interneuronas SOM que se conducen a las dendritas durante los estímulos aversivos incrementan la respuesta de las células principales y reduce el aprendizaje del miedo (Honoré, 2021).

Debido a que la función sináptica y la plasticidad del hipocampo se disminuyen en las enfermedades cerebrales relacionadas con el trastorno cognitivo, en específico la enfermedad de Alzheimer, la alteración de las interneuronas SOM también puede ayudar en la generación de estas deficiencias cognitivas (Honoré, 2021).

3.4 Efecto nootrópico

Los receptores de acetilcolina (Ach) se caracterizan por ser metabotrópicos que se sintetizan en el núcleo basal de Meynert y la proyección del núcleo basal, por lo cual participan como la fuente primaria de Ach neocortical. La Ach es importante para funciones de aprendizaje y memoria, ya su origen está dado en la corteza del prosencéfalo basal, por lo que se encuentra relacionada con la consolidación de la memoria (Kandimalla, 2017).

El desarrollo en la investigación que explora los mecanismos biológicos relacionados con el aprendizaje y la memoria ha descubierto vías para el tratamiento farmacológico de la disminución cognitiva asociada con el envejecimiento y los trastornos cerebrales. Esto ha permitido la creación de potenciadores cognitivos nootrópicos, fármacos considerados en el tratamiento de déficits cognitivos en personas que padecen alzheimer, esquizofrenia, accidente cerebrovascular, trastornos por déficit de atención relacionados con hiperactividad o envejecimiento (Froestl, 2012).

La innovación de potenciadores se ha logrado por medio de modelos animales en los que se miden los resultados conductuales que están relacionados con aspectos particulares de la función cognitiva, con lo obtenido se han identificado mecanismos moleculares específicos que se pueden convertir en objetivo de los potenciadores cognitivos (Roesler, 2011).

3.5 Receptor sigma-1 (σ_1)

El receptor sigma-1 es un polipéptido, con peso molecular de 29 kDa, conformado por 223 aminoácidos y 2 dominios transmembranales con amplias aplicaciones neurofarmacológicas. Estos receptores regulan la actividad de canales iónicos modulados por voltaje y activados por ligandos, se genera la intraseñalización de Ca^{2+} celular y se liberan los neurotransmisores de Ach y Glu, por lo cual está implicado en distintos trastornos cerebrales como la enfermedad de alzheimer, parkinson, depresión y esquizofrenia (Ramakrishnan, 2015).

Se ha señalado que los receptores sigma-1 intervienen activamente en la defensa celular endógena frente a enfermedades neurodegenerativas, por medio de la regulación del estrés oxidativo, la apoptosis, la señalización de Ca^{2+} en la membrana asociada a la mitocondria (MAM) y el metabolismo mitocondrial. Estas observaciones han permitido el estudio activo de los receptores en la enfermedad de alzheimer como un objetivo terapéutico a desarrollar (Maurice, 2017).

Mantiene características estructurales y funcionales que desempeñan un papel fundamental para impactar la transducción de señalización y estar relacionado en la regulación del aprendizaje, memoria, emoción, sistemas sensoriales, desarrollo

neuronal y cognición debido a esta relación se ha convertido en un objetivo farmacológico para tratar diversos trastornos neurológicos y neuropsiquiátricos (Ye, 2020).

El receptor sigma-1 se encuentra distribuido a lo largo del organismo, se localiza primordialmente en el SNC, específicamente en la asta dorsal de la médula espinal y en la membrana asociada a la mitocondria. Dentro de sus actividades se ha encontrado que es una proteína chaperona del retículo endoplásmico, su actividad es modulada por la unión de diferentes ligandos también participan en la regularización de la señalización de Ca^{2+} , a través del receptor inositol 1,4,5-trifosfato en la membrana asociada a la mitocondria, de esta forma se promueve el movimiento del ion Ca^{2+} a la mitocondria y activando la generación de ATP también participa en la regulación de la actividad de canales iónicos (Na^+ y K^+) así como receptores acoplados a proteínas G (opioides, D2 y μ) (Maurice, 2017).

3.6 Inhibidores de acetilcolinesterasa

La acetilcolinesterasa es una enzima valiosa involucrada en el sistema nervioso colinérgico tanto a nivel periférico (SNP) como en SNC. Su principal función es catalizar la hidrólisis de Ach para originar iones de colina y acetato. El sitio activo de acetilcolinesterasa es una cavidad hidrofóbica que consta de dos partes: una parte esteárica y un sitio de unión al sustrato aniónico. Esta enzima es fundamental en la hidrólisis de acetilcolina y también el objetivo de la mayoría de los fármacos utilizados en el tratamiento de alzheimer, pero estos fármacos se caracterizan por proporcionar únicamente un tratamiento sintomático y mantienen la característica de pérdida de eficacia terapéutica con el tiempo (Sharma, 2019).

Los inhibidores de colinesterasa son fármacos usados en muchos países para el tratamiento principalmente de alzheimer estos son el donepezilo, galantamina, rivastigmina y memantina, este último se caracteriza por ser un antagonista no competitivo de los receptores del ácido N-metil-D-aspártico (NMDA). Los tres fármacos restantes son inhibidores de las colinesterasas. En el caso del donepezilo es un inhibidor reversible de acetilcolinesterasa. En el organismo se propaga por las proteínas plasmáticas y el tiempo medio dentro del mismo es de 3 días también se

metaboliza parcialmente por las isoenzimas 3A4 y 2D6 del citocromo P-450. Otro fármaco de gran interés es la galantamina mantiene mayor potencia que el donepezilo con un tiempo medio de 10 horas. Sin embargo, se metaboliza por las mismas estructuras y se caracteriza por ser un inhibidor no competitivo de acetilcolinesterasa que se relaciona con sitios aniónicos y periféricos (Pohanka, 2012).

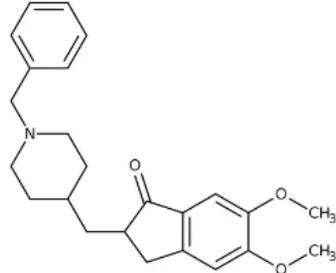
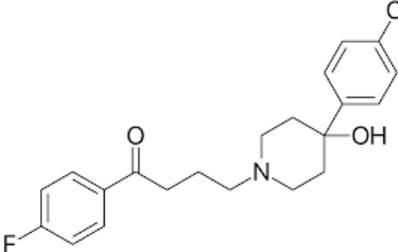
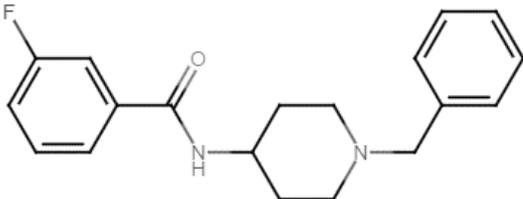
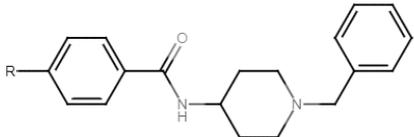
La rivastigmina es un carbamato que inhibe la acetilcolinesterasa, por lo cual se puede administrar en pacientes con fase leve a moderada de alzheimer también en esta línea de fármacos se encuentra la huperzina presente en dos formas A y B. En este caso la A es la que se utiliza para fines farmacológicos que se caracteriza por ser un potente antagonista del receptor NMDA e inhibidor no competitivo de acetilcolinesterasa (Pohanka, 2012).

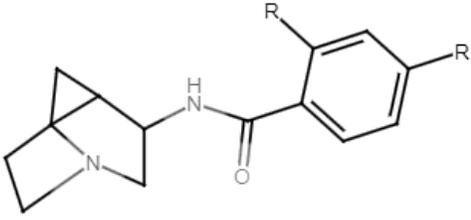
3.7 Diseño de compuestos híbridos de antagonistas del receptor sigma-1 e inhibidores de acetilcolinesterasa

El LMH-2 es un fármaco sintetizado por el Dr. Gabriel Navarrete Vázquez de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, este compuesto tiene propiedades antihiperlagésicas y antialodínicas en un modelo de constricción crónica en rata (Deciga-Campos et al., 2021). El diseño de este compuesto tiene como estructura base al haloperidol, un fármaco empleado como antipsicótico al que se le han atribuido propiedades analgésicas mediante la actividad antagónica del receptor sigma-1. Entonces LMH-2 tiene como posible mecanismo de acción la actividad antagónica del receptor sigma-1. Considerando este mecanismo de acción el mismo grupo de trabajo modificó la estructura química del LMH-2, combinando con la estructura base de donepezilo, es un fármaco altamente selectivo e inhibidor reversible de acetilcolinesterasa, para generar una nueva serie híbrida de compuestos denominados serie ROE. De esta serie se diseñaron 12 compuestos para su estudio, los compuestos ROE (1-14) fueron evaluados *in silico* mediante distintas herramientas químico-informáticas tales como ADMETSar, PreADMET y ACD/Toxsuite. El estudio *in silico* reveló que estas estructuras tienen un adecuado

score de unión al receptor sigma-1 y no presentaron toxicidad por lo que son candidatos para evaluar *in vivo*.

Tabla 2. Estructuras base y compuestos híbridos

Compuesto	Estructura																				
Donepezilo																					
Haloperidol																					
LMH-2																					
ROE (1-8)	 <table border="1" data-bbox="462 1556 1469 1837"> <thead> <tr> <th colspan="4" data-bbox="462 1556 1469 1612">R =</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="462 1612 708 1669">ROE-1</td> <td data-bbox="708 1612 969 1669">CH₃</td> <td data-bbox="969 1612 1247 1669">ROE-5</td> <td data-bbox="1247 1612 1469 1669">4-Bifenilo</td> </tr> <tr> <td data-bbox="462 1669 708 1726">ROE-2</td> <td data-bbox="708 1669 969 1726">2-Naftoilo</td> <td data-bbox="969 1669 1247 1726">ROE-6</td> <td data-bbox="1247 1669 1469 1726">CF₃</td> </tr> <tr> <td data-bbox="462 1726 708 1782">ROE-3</td> <td data-bbox="708 1726 969 1782">3-Bifenilo</td> <td data-bbox="969 1726 1247 1782">ROE-7</td> <td data-bbox="1247 1726 1469 1782">t-Butilo</td> </tr> <tr> <td data-bbox="462 1782 708 1837">ROE-4</td> <td data-bbox="708 1782 969 1837">1-Naftoilo</td> <td data-bbox="969 1782 1247 1837">ROE-8</td> <td data-bbox="1247 1782 1469 1837">3,4-Dicloro</td> </tr> </tbody> </table>	R =				ROE-1	CH ₃	ROE-5	4-Bifenilo	ROE-2	2-Naftoilo	ROE-6	CF ₃	ROE-3	3-Bifenilo	ROE-7	t-Butilo	ROE-4	1-Naftoilo	ROE-8	3,4-Dicloro
R =																					
ROE-1	CH ₃	ROE-5	4-Bifenilo																		
ROE-2	2-Naftoilo	ROE-6	CF ₃																		
ROE-3	3-Bifenilo	ROE-7	t-Butilo																		
ROE-4	1-Naftoilo	ROE-8	3,4-Dicloro																		

ROE (10-14)				
	R =			
	ROE-10	3,4-Dicloro	ROE-12	CF ₃
	ROE-11	F	ROE-13	t-Butilo
	ROE-14		1-Naftoilo	

3.8 Mecanismos moleculares de la pérdida de cognición

La proteína precursora beta amiloide (β -APP) es una proteína de membrana que se encuentra al final de los axones presinápticos. Se caracteriza por tener dos partes una extracelular y una pequeña intracelular. En algunos casos las enzimas beta-secretasa y gamma-secretasa cortan la beta amiloide, para obtener un péptido similar (Radaghdam, 2021).

Las enzimas secretasas generan un péptido A β por medio de un procesamiento proteolítico con la finalidad de estimular la supervivencia neuronal. Los péptidos A β se caracterizan por ser productos naturales producidos por el propio metabolismo con 36-43 aminoácidos. Los amiloides sinápticos permiten a nivel fisiológico la modulación de los mensajes de estímulo y de tal forma evitar el accionar excesivo de las neuronas. También se sugiere que está relacionada con el aprendizaje y la memoria, por lo cual en niveles bajos potencializa a largo plazo el hipocampo de esta forma se mejora la memoria, lo que permite que sea un modulador positivo para la neurotransmisión (Radaghdam, 2021).

Un cambio en las β -APP y sus enzimas relacionadas guían a la enfermedad de alzheimer prematuro. La elaboración y el depósito del péptido A β es de gran importancia en el desarrollo de la enfermedad del alzheimer al dañar el estrés oxidativo, la inflamación y el daño de la membrana. Debido a su enorme producción

de A β , el cual puede suceder a través de un proceso anormal de APP o un mal funcionamiento en la eliminación de A β por medio de la fagocitosis de la microglía o la degradación enzimática (Radaghdam, 2021).

Otra proteína de gran relevancia es la denominada Tau que se encarga de estabilizar los microtúbulos en el citoesqueleto de las neuronas, el cual permite el crecimiento de las neuritas también interacciones de la membrana y facilita la fijación de enzimas, así como traslado axonal de orgánulos a las terminaciones nerviosas. La fosforilación de Tau normaliza la unión y ensamblaje de los microtúbulos. En el caso del alzheimer se ha demostrado que Tau está hiperfosforilada, por lo cual se aglomeran en las neuronas y forman filamentos helicoidales, esto provoca que Tau disminuya su capacidad de unirse con microtúbulos, por lo cual se produce una neurodegeneración (Serý, 2013).

La unión irregular de la proteína Tau hiperfosforilada en los microtúbulos de las personas que presentan alzheimer genera inestabilidad de estos y permite un accionar por parte del transporte axonal anormal que está directamente relacionado con los microtúbulos. La supresión del transporte axonal guía a una acumulación de APP en el cuerpo celular también se ha demostrado que el propio transporte axonal anormal de orgánulos, incluyendo las mitocondrias, provoca estrés oxidativo (Serý, 2013).

3.9 Epidemiología de alzheimer

El alzheimer es una enfermedad neurodegenerativa que daña al cerebro y provoca la pérdida de capacidades cognitivas con el tiempo (Hardan, 2021). El factor principal de riesgo para la enfermedad del alzheimer es el envejecimiento, por lo cual afecta en gran medida a las personas mayores de 65 años (alrededor del 90 % de los casos) y su prevalencia se duplica cada 5 años, ocasionando un aumento exponencial dependiente del tiempo (Xia, 2021).

Entre sus síntomas principales se puede destacar (Figura 4):

- Deterioro gradual de la memoria, el pensamiento y las habilidades sociales del paciente.

- Disminución en la capacidad para realizar tareas básicas.
- Genera distintos problemas en algunos procesos fisiológicos como la deglución, control de la vejiga, deshidratación y desnutrición.
- Son susceptibles a neumonía o infecciones.



Figura 4. Principales síntomas de la pérdida de memoria (Xia, 2021).

Las estadísticas marcan que la enfermedad de Alzheimer es la principal causa de demencia, ya que representa alrededor del 60 % al 80 %. Las personas al ser diagnosticadas pueden vivir una vida normal de cuatro a ocho años (Hardan, 2021).

En el año de 2018 se estimó una prevalencia de 50 millones en el mundo donde se espera se triplique, para el 2050. Además, los datos han permitido establecer que para el mismo año la prevalencia de la demencia en Europa se duplicará. También los datos han propiciado que la incidencia en los países de alta economía disminuya (López, 2022).

En el caso de México esta enfermedad afecta principalmente a los adultos mayores de 60 años, esto representa alrededor del 10.4 % de la población del país en 2015, se espera que el porcentaje se duplique para el 2029 (Castillo, 2021).

3.10 Modelos experimentales para evaluar la cognición

Los roedores se han utilizado en distintas pruebas como: laberinto en Y, discriminación social, reconocimiento de objetos, evaluación automatizada del aprendizaje y memoria en una caja; por último, el aprendizaje de discriminación olfativa. Los resultados obtenidos en estos modelos funcionan para desarrollar terapias contra enfermedades que involucran deterioro cognitivo (Hölter, 2015).

Los peces también se han utilizado para evaluar la retención de memoria, en una prueba de discriminación de objetos en donde se utiliza escopolamina después de un periodo de habituación de 3 días en un tanque experimental, en donde se entrena al pez durante 10 minutos con una esfera o un cubo negro. El comportamiento del pez se caracteriza por el reconocimiento de los objetos, a los objetos con que se ha familiarizado los rodea de forma circular mientras que con los que no se sentía familiarizado solo daba una vuelta rápida por ellos (Stefanello, 2019).

Los modelos en peces se han tratado de semejar a los modelos en roedores; por ejemplo, se ha tratado de que los peces se adapten a objetos nuevos como se hace con los roedores. En una prueba se coloca al pez durante 25 minutos (fase de exposición) a un objeto, posteriormente se expone al pez en una nueva etapa donde se elige entre el objeto nuevo y el familiar que se distinguen por forma y color (fase prueba). En ambas etapas, el pez cebra demostró una tendencia a explorar un nuevo objeto, ya que puede memorizar las particularidades del objeto y utilizar esa información cuando se mostró el segundo objeto independientemente del retraso (2,6 o 24 horas) que separaron las fases. Con base en estos resultados se ha sugerido que el rendimiento en la memoria de los peces puede evaluarse mediante esta prueba simple (Lucon, 2014).

En un estudio reciente se demostró la utilidad de una planta popular de los países asiáticos como el *Streblus asper* en una prueba de memoria espacial. Para investigar la disminución del deterioro de la memoria provocado por escopolamina (200 μ M) en el pez cebra se utilizó la prueba del laberinto en T de acondicionamiento del apetito con sesgo de color mientras que la memoria de miedo se midió mediante la prueba de evitación inhibitoria. El extracto de *Streblus asper* se evaluó a diferentes dosis (200, 400 y 800 mg/kg) y los resultados fueron comparados con el grupo de escopolamina y rivastigmina (1.5 mg/kg) como control positivo. Se determinó que el extracto de *Streblus asper* disminuyó el deterioro de la memoria en la prueba de evitación inhibitoria enlazada con la memoria del miedo (Singsai, 2021).

3.11 *Danio rerio* como modelo experimental de cognición

El pez cebra (*Danio rerio*) es una especie que fue utilizado por vez primera como modelo de estudio por George Streisinger en los años de 1970, el cual mantiene distintas características como (Figura 5):

- Proviene de aguas dulces de climas tropicales principalmente de los ríos al sur del Himalaya en India, Nepal, Pakistán, Bangladesh y Myanmar.
- Es un pez que corresponde a la familia Cyprinidae.
- Mantener distintas similitudes fisiológicas y genéticas con los humanos, como el cerebro, el tracto digestivo, la vascularización y el sistema inmune.
- El 70 % de los genes pertenecientes a enfermedades en humanos se relacionan con el pez cebra.
- Su reproducción es fácil y de bajo costo.



Figura 5. Pez cebra (Rahman, 2018).

3.11.1 Reproducción

El desarrollo del embrión es rápido se caracteriza por presentar en las primeras 3 horas la blástula, para dar paso a las 5 horas a la gástrula. Posteriormente, a las 18 horas se puede observar en el embrión distintas partes del pez cebra ya que es transparente tales como oídos, ojos, músculos y cerebro. Dadas las 24 horas se presenta la denominada segmentación donde se han desarrollado la gran mayoría de órganos. Hacia las 72 horas se muestra el periodo de eclosión obteniéndose una larva temprana la cual comienza a buscar comida a los 2 días posteriores (Rahman, 2018).

En 4 días se obtiene una versión de pez cebra de temprana edad adulta, sin embargo, se considera adulto a los 3 meses ya que ha alcanzado su madurez

sexual. El ciclo de reproducción permite obtener 200 huevos por semana, por lo cual se pueden obtener peces durante todo el año (Rahman, 2018).

3.11.2 Importancia como modelo de estudio

El pez cebra se ha utilizado en los últimos años en el área de fisiología, metabolismo de fármacos, farmacología y toxicología. Actualmente se conocen secuencias de proteínas semejantes entre peces y humanos. La similitud en sitios activos de enzimas, canales y receptores ha permitido el uso de esta especie como herramienta farmacológica (Macrae, 2015).

Se tienen estudios de farmacodinamia y farmacocinética en donde se han estudiado procesos de distribución, metabolismo y excreción. En el caso de la distribución se ha encontrado una regulación del fármaco a través de límites fisiológicos activos, como la barrera hematoencefálica y por transportadores específicos de tejidos. Para el metabolismo solo se ha encontrado una relación en la formación del citocromo P450 (CYP). En el caso de la excreción esta se regula por el pez cebra al igual que en el humano, sin embargo, hace falta mayor estudio para entender la filtración y reabsorción del fármaco (Macrae, 2015).

IV Planteamiento del problema

En el presente, persiste una elevada prevalencia de las enfermedades neurodegenerativas dentro de las que toman gran relevancia las enfermedades involucradas en la demencia como el parkinson, problemas de lenguaje y la memoria. Con base en cifras por distintos estudios se conoce que alrededor del mundo existen 70 millones de personas que padecen alguna enfermedad neurodegenerativa, lo que ha permitido pronosticar cifras para 2030 donde se considera que habrá un aumento de 50 % para las personas de 60-80 años mientras que un 200 % para aquellas mayores de 80 años. Un factor para considerar es que debido al aumento de la esperanza de vida se espera crezca el número de personas mayores, por tanto, aumente el número de personas con enfermedades neurodegenerativas, por lo cual se genera mayor incidencia en déficits neurológicos y demencia.

Actualmente una enfermedad que se encuentra en auge es el alzheimer, ésta se caracteriza por la pérdida de la cognición que es de alta relevancia clínica ya que representa la principal causa de demencia, alrededor del 60 % al 80 %. Es importante señalar que su prevalencia se duplica cada 5 años posteriores a los 65 años. En el caso de México esta enfermedad afecta principalmente a los adultos mayores de 60 años, esto representa alrededor del 10.4 % de la población del país en 2015, se espera que el porcentaje se duplique para el 2029. Como parte de la terapéutica se tienen pocos fármacos para el tratamiento a largo plazo como el donepezilo, la galantamina, la rivastigmina y la memantina donde su principal eficacia se presenta en la función cognitiva, aunque es limitada y en dosis altas están asociados a efectos adversos como náuseas, vómito, fatiga, somnolencia, dolor de cabeza, en ocasiones anorexia, problemas respiratorios, cardiovasculares e infecciones urinarias por mencionar algunos. Cada uno de estos efectos ha ocasionado que se requieran mayores fármacos con alta selectividad y dirigidos a la pérdida de cognición.

El haloperidol es un fármaco que recientemente se ha reposicionado como analgésico para el tratamiento del dolor neuropático mediante la activación del

receptor sigma-1 como antagonista. A partir de este fármaco se diseñaron una serie de análogos estructurales con actividad antagonista sigma-1, LMH-2 resultó ser un fármaco que actúa como antihiperálgico y antialodínico en ratas Wistar. Por otra parte, se sabe que uno de los fármacos que se utiliza para recuperar la cognición es el donepezilo, este fármaco tiene como mecanismo de acción inhibir la enzima acetilcolinesterasa. Debido a que se tienen pocas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la cognición, se diseñó una serie de compuestos híbridos de LMH-2 y donepezilo, con la idea de aumentar el efecto nootrópico y analgésico. Esta serie nueva de compuestos se denominó serie ROE-1 – ROE-14 los cuales mediante el análisis *in silico* se determinó que pueden tener potencial efecto nootrópico. En el presente proyecto se plantea la evaluación preliminar de estos compuestos en un modelo animal experimental de memoria en *Danio rerio*.

V Pregunta de investigación

¿Los compuesto de la serie ROE-1 - ROE-14 presentan efecto nootrópico en un modelo de pérdida de cognición por escopolamina en *Danio rerio*?

VI Objetivos

6.1 General

Realizar la evaluación de la actividad nootrópica de los compuestos híbridos de antagonistas de receptores sigma-1 e inhibidores de acetilcolinesterasa de la serie ROE-1 – ROE-14 en *Danio rerio*.

6.2 Específicos

- Establecer que la administración de escopolamina genera pérdida de la cognición en la especie *Danio rerio*.
- Establecer que la administración de LMH-2 y donepezilo genera un efecto nootrópico en un modelo de pérdida de la cognición por escopolamina en la especie *Danio rerio*.
- Establecer que la administración de haloperidol, LMH-2 y la serie ROE-1 – ROE-14 genera un efecto nootrópico en un modelo de pérdida de cognición por escopolamina en la especie *Danio rerio*.

VII Método

7.1 Universo

Se utilizaron grupos experimentales formados por 8 peces cebra (*Danio rerio*), adultos de ambos sexos de 60-90 días (2.5 ± 0.5 cm de tamaño y peso de 0.8 ± 0.1 g). Los peces se acondicionaron durante cuatro semanas en ciclos de luz/oscuridad de 12x12 h antes de la fase experimental, se utilizó un tanque de vidrio con filtros de agua y bombas de aire a 25°C, el agua utilizada se mantuvo a un pH igual a 7.0. Los peces *Danio rerio* recibieron alimento *ad libitum*, hojuelas básicas para peces tropicales (Marca Biomsa S.A. de C.V.). Posterior a la experimentación, los animales se sacrificaron por inmersión en agua con hielo (2-4°C) hasta la pérdida de movimiento.

7.2 Materiales y reactivos

- Se utilizó una pecera de (20x25x13 cm) dividida en dos secciones para tener un segmento con luz y otro con oscuridad, filtros de agua, bombas de aire, hielo, hojuelas de alimento, cilindro (23 cm de altura, 9.5 cm de diámetro), cronómetro.
- El donepezilo, la escopolamina se adquirieron de Sigma-Aldrich Química S de RL de CV, México. Los compuestos ROE-1 – ROE-14 fueron sintetizados por el Dr. Gabriel Navarrete Vázquez de la Facultad de Farmacia de la UAEM.

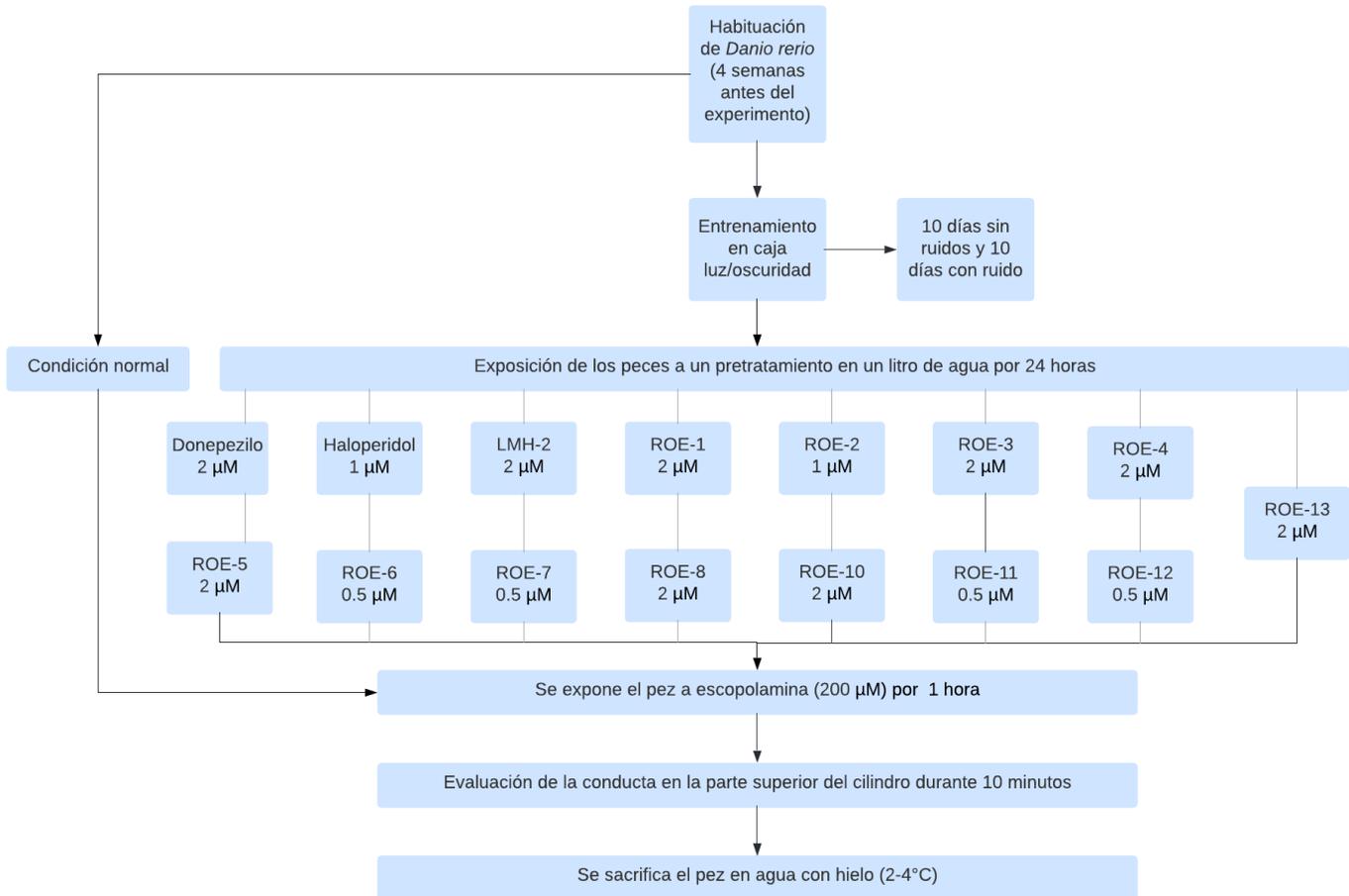
7.3 Variables

- Independientes: hora de evaluación del efecto, ruido ambiental, temperatura.
- Dependientes: tiempo de permanencia de *Danio rerio* en la parte superior del cilindro.

7.4 Hipótesis

Los compuestos químicos de la serie ROE (ROE-1 – ROE-14) con estructura híbrida de análogos estructurales de antagonistas de receptores sigma-1 e inhibidores de acetilcolinesterasa, tienen efecto nootrópico en *Danio Rerio*.

7.5 Diseño de estudio



*Los compuestos ROE-9 y ROE-14 no se evaluaron debido a que se obtuvo poca cantidad en la síntesis química.

** Los compuestos a 0.5 µM fueron evaluados a esa concentración porque a 1 µM fueron tóxicos y generaron muerte en los peces.

7.6 Procedimiento

El modelo se divide en dos fases de habituación. En ambas fases se utiliza una pecera (20x25x13 cm) dividida en dos secciones, una zona luminosa y una zona oscura dividida por una puerta de vidrio, la pecera contiene solo 3 cm de nivel de agua. La puerta de vidrio se levanta hasta un centímetro sobre la base de la pecera en esta distancia está abierta la puerta para dejar libre el paso del pez a través de las dos secciones.

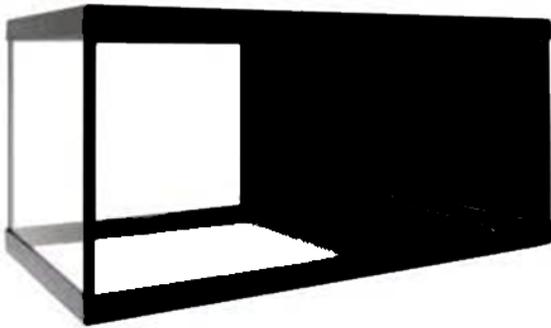
Para el aprendizaje de la primera fase de la habituación se colocó al pez en la zona luminosa y se deja explorar la pecera durante 1 minuto, luego se levanta la compuerta para que pueda pasar a la zona oscura y se deja libre el paso durante 10 minutos. Después se regresa al pez a su tanque de almacenamiento. Este procedimiento se repite durante 10 días, entonces el pez aprenderá a entrar a la zona oscura que considera segura.

En la segunda fase se repite el mismo procedimiento, se coloca al pez en la zona luminosa y después de un minuto se abre la compuerta para que pase a la zona oscura. Sin embargo, cada vez que el pez entra a la zona oscura se coloca un estímulo mecánico que genera ruido, esto ocasiona temor en el pez y disminuye la entrada a esta zona, el entrenamiento con el ruido también se realizará durante 10 días.

Después de las fases de habituación, en el día 20, después del entrenamiento con ruido se introduce el pez en el pretratamiento (donepezilo, haloperidol, LMH-2 y ROE) durante 24 h. Posteriormente, al día 21 se introduce en una solución de escopolamina 200 μM durante 60 minutos y se pasa a la caja luz/oscuridad durante 10 minutos con la puerta abierta y sin ruido. Al finalizar este tiempo se coloca en un cilindro de vidrio, un ambiente nuevo. El cilindro está dividido en dos partes (la parte inferior tiene una distancia de 5 cm y la parte superior de 10 cm) por una línea imaginaria para obtener un área de 10 y 5 cm respectivamente. La conducta evaluada en el presente proyecto fue la "latencia de permanencia del pez cebrá en la parte superior del cilindro", en el espacio que comprende los 10 cm. El conteo se

realizó en períodos de 2 minutos hasta obtener un total de 10 minutos. El entrenamiento y la evaluación de los peces se realizó uno por uno.

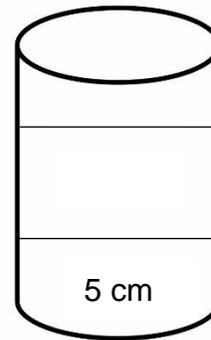
A)



Zona de luz

Zona oscura

B)



$$A = 440.22 \text{ cm}^2$$

$$V = 708.82 \text{ cm}^3$$

$$A = 290.99 \text{ cm}^2$$

$$V = 354.41 \text{ cm}^3$$

Figura 6. Peceras utilizadas en el modelo de cognición. Panel A: pecera de vidrio (20x25x13 cm) de luz/oscuridad. Panel B: cilindro de vidrio (23x9.5 cm) dividido en dos segmentos.

7.7 Análisis estadístico

Los resultados se graficaron en cursos temporales (tiempo vs latencia de permanencia en la parte superior). De los cursos temporales se determinará el área bajo la curva (ABC) mediante el método de los trapecios. Se realizaron gráficas de barras de cada uno de los tratamientos con su respectiva ABC. Para el análisis estadístico se utilizará un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Dunnett para comparar con respecto al vehículo y una prueba de Tukey para comparar entre los diferentes tratamientos (nivel de significancia $p < 0.05$).

VIII Resultados

8.1 Comportamiento de *Danio rerio* en condición normal y habituación

Los peces que se sometieron a un procedimiento de habituación en una caja de luz/oscuridad con y sin ruido mecánico durante 20 días, fueron evaluados en su conducta de exploración en un ambiente nuevo “un cilindro de exploración” al día 21 de habituación. Durante 10 min se cuantificó la movilidad del pez en la zona superior del cilindro. La conducta normal de *Danio rerio* se determinó en peces que no fueron sometidos al periodo de habituación en la caja de luz/oscuridad. En la figura 7 (panel A) se observa en un curso temporal (tiempo vs latencia en la parte superior del cilindro) que durante los primeros 4 minutos el pez se mantiene nadando en la parte inferior y a medida que transcurre el tiempo aumenta su latencia hasta un efecto máximo en 8 minutos (0.8 ± 0.1). En el caso de la habituación de la fase I y II animales en presencia del estímulo mecánico, se observa un comportamiento similar creciente; primero permanece en la parte baja del cilindro y gradualmente incrementa su tiempo de permanencia en la parte superior con un efecto máximo en 8 min (1.5 ± 0.1) (Fig. 7, Panel B). Se observa una diferencia estadística entre la conducta normal del pez (4.96 ua) con respecto al periodo de habituación (11.26 ua); t de Student ($p \leq 0.05$).

8.2 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en un cilindro con escopolamina

Cuando el pez es inmerso en escopolamina ($200 \mu\text{M}$) el pez nada en la parte inferior inicialmente y conforme aumenta su tiempo en la parte superior llega a un efecto máximo a los 8 minutos, en la figura 8 se observa un tiempo en promedio de 1.5 ± 0.1 minutos en peces con habituación y 0.7 ± 0.1 minutos en peces con escopolamina o conducta normal o normal. El efecto total de la evaluación de la conducta por parte de la escopolamina es 4.54 ua. Entre los grupos existe una diferencia estadística por medio de una ANOVA de una vía ($F_{3,23} = 23.54$) y mediante una comparación múltiple se conoce que existe una diferencia estadística entre el comportamiento de la escopolamina y habituación ($p \leq 0.05$). En caso contrario por parte de escopolamina y condición normal no hay presencia de esta.

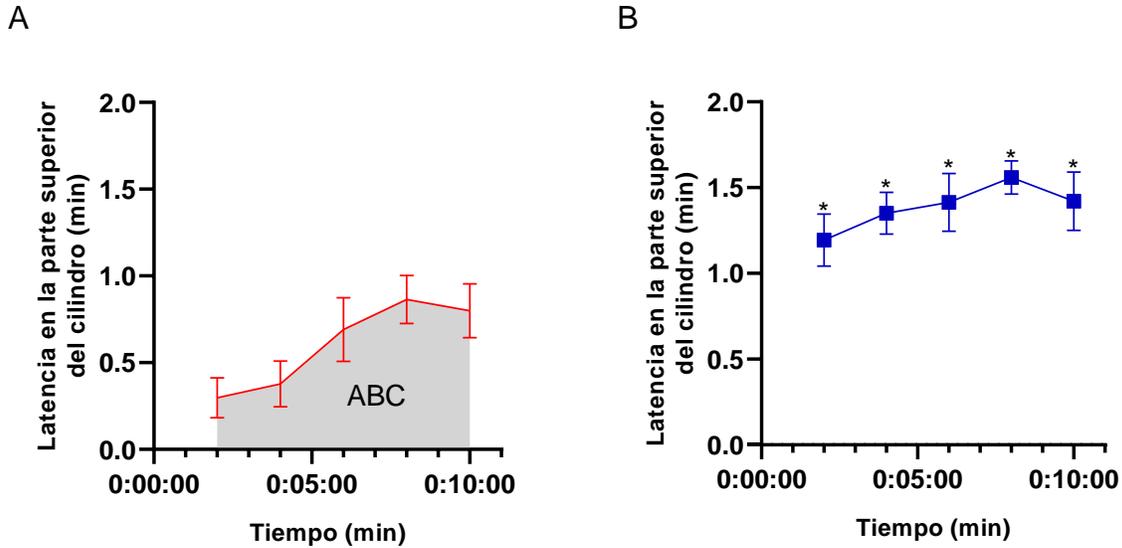


Figura 7. Conducta normal y con habituación del pez cebra en un cilindro de exploración. Curso temporal de la conducta normal (Panel A) y con habituación con ruido mecánico (Panel B) de *Danio rerio* en un cilindro de exploración. El ABC se determinó mediante el método de los trapecios. Cada grupo experimental representa el promedio de 8 animales \pm E.E.M. La diferencia estadística entre ambos grupos se determinó por una prueba de t de Student ($p \leq 0.05$).

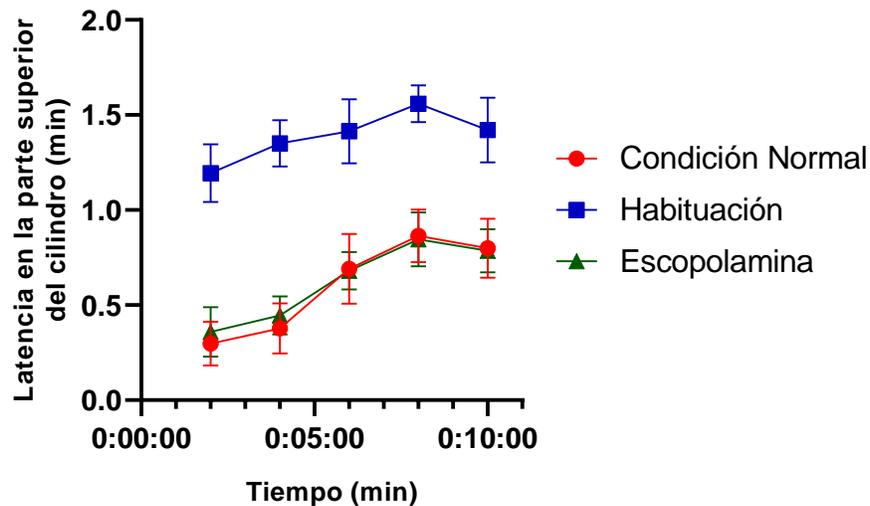


Figura 8. Curso temporal de la conducta normal, habituación y escopolamina de *Danio rerio* en un cilindro de exploración. Peces sin adaptación (línea roja). Los peces con habituación (línea azul). Peces sometidos a inmersión con escopolamina 200 μ M (línea verde). Cada grupo representa el promedio de 8 animales \pm E.E.M. La diferencia estadística entre los grupos se determinó con una prueba ANOVA de una vía y post hoc de Tukey ($p \leq 0.05$).

8.3 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en donepezilo

La conducta presentada por el pez ante la presencia de donepezilo (2 μM) es similar (4.54 ua) a la condición normal (4.96 ua). Sin embargo, cuando se coloca el pez en donepezilo y posteriormente con escopolamina (200 μM) el efecto se incrementa (12.64 ua) con respecto a los peces que solo fueron inmersos en escopolamina (4.54 ua) y en comparación con la habituación (11.26 ua). Entre los grupos existe una diferencia estadística evaluada por ANOVA de una vía ($F_{4,39} = 39.62$) y mediante comparaciones múltiples se conoce que existe una desigualdad estadística entre los grupos ($***p \leq 0.001$) (Fig.9).

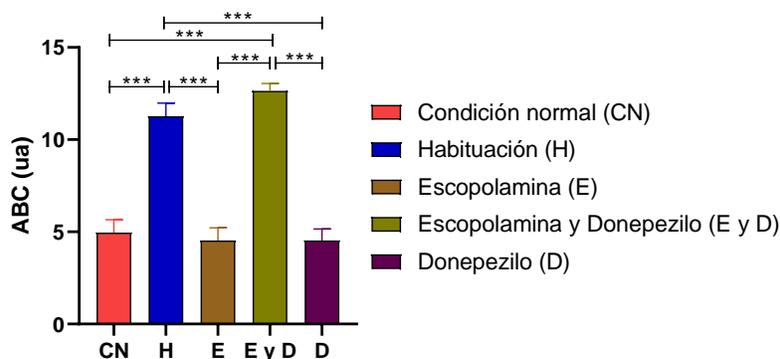


Figura 9. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y diferentes fármacos. Condición normal (barra roja), habituación (barra azul), escopolamina (barra café), escopolamina con donepezilo (barra verde) y donepezilo (barra morada). Cada grupo representa el promedio de 8 animales \pm E.E.M. La diferencia estadística entre los grupos se determinó con una prueba ANOVA de una vía y post hoc de Tukey ($***p \leq 0.001$).

8.4 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en haloperidol

En la figura 10 se muestra el efecto que generó la exposición del pez a haloperidol (1 μM), se observa que la actividad aumentó (9.68 ua) con respecto a la actividad normal (4.96 ua). También se observa que cuando el pez es inmerso en haloperidol y escopolamina (200 μM) no se modifica la actividad con respecto al grupo de escopolamina (4.54 ua). Entre los grupos existe una diferencia estadística evaluada por ANOVA de una vía ($F_{4, 39} = 7.25$) y mediante comparaciones múltiples está presente una desigualdad estadística entre los grupos ($*p \leq 0.05$).

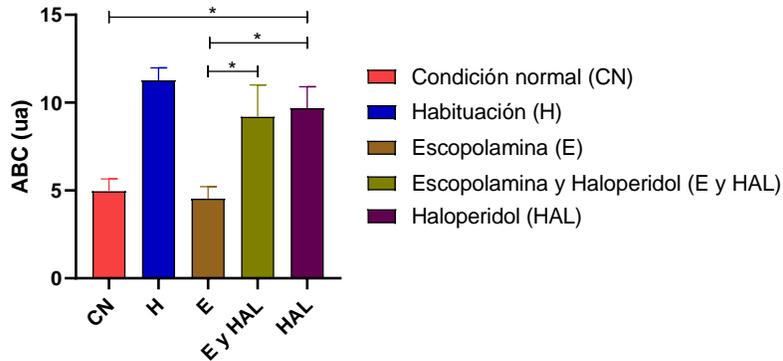


Figura 10. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y diferentes fármacos. Condición normal (barra roja), habitación (barra azul), escopolamina (barra café), escopolamina con haloperidol (barra verde) y haloperidol (barra morada). Cada grupo representa el promedio de 8 animales \pm E.E.M. La diferencia estadística entre los grupos se determinó con una prueba ANOVA de una vía y post hoc de tukey (* $p \leq 0.05$).

8.5 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en LMH-2

Con respecto al LMH-2 (2 μ M) se observó un efecto semejante al haloperidol, ya que cuando el pez es inmerso en LMH-2 aumenta su conducta (10.68 ua) con respecto al grupo normal (4.96 ua) y al grupo escopolamina (4.54), igual que el haloperidol cuando se expone a los peces a LMH-2 y escopolamina se presenta el mismo efecto (ua) que el grupo de LMH-2 (Fig. 11). La diferencia estadística entre LMH-2 y escopolamina se determinó por una ANOVA de una vía ($F_{4,39} = 27.15$) y mediante comparaciones múltiples se presenta una desigualdad estadística entre los grupos (***) ($p \leq 0.001$).

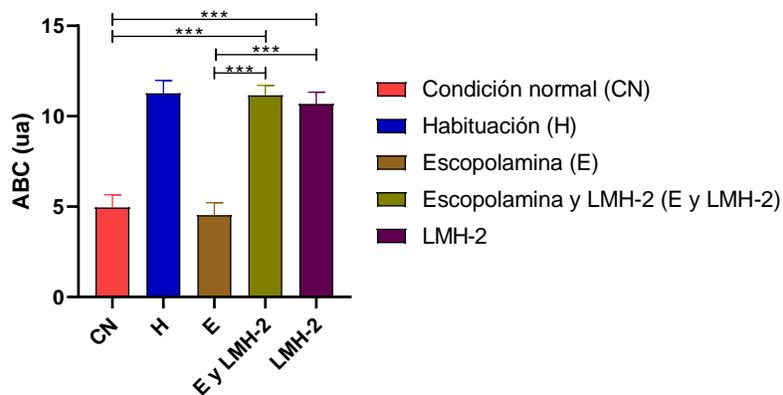


Figura 11. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y diferentes compuestos. Condición normal (barra roja), habitación (barra azul), escopolamina (barra

café), escopolamina con LMH-2 (barra verde) y LMH-2 (barra morada). Cada grupo representa el promedio de 8 animales \pm E.E.M. La diferencia estadística entre los grupos se determinó con una prueba ANOVA de una vía y post hoc de tukey (** $p \leq 0.01$).

8.6 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en la serie ROE (ROE-1 – ROE-14)

La conducta del pez mediante la presencia de compuestos de tipo amida y quinuclidinas de la serie ROE (ROE-1 – ROE-14) y su combinación con escopolamina en comparación con la condición normal, habituación y escopolamina durante 10 minutos en un cilindro de exploración contando su latencia en la parte superior. Se clasificó de acuerdo con la similitud con los fármacos de control (donepezilo y haloperidol) y como actividad inespecífica aquellos con un comportamiento diferente a estos.

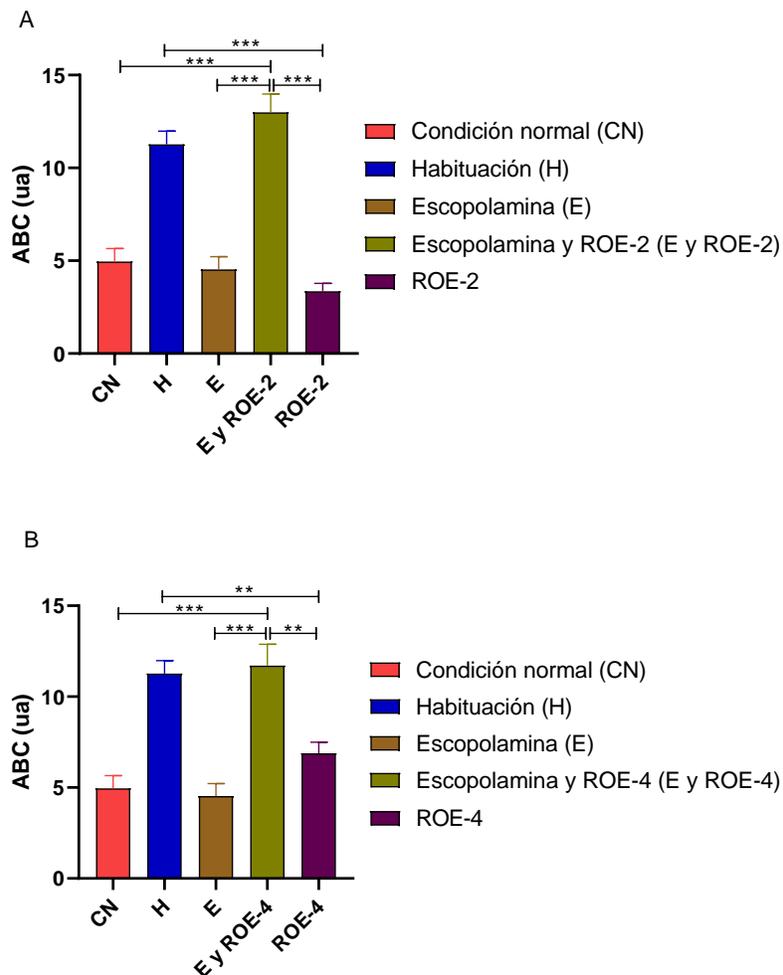
8.6.1 Compuestos híbridos de la serie ROE parecidos a donepezilo

En la figura 12 se muestra un efecto que presentaron los compuestos de la serie ROE con una actividad semejante a la de donepezilo. ROE-2, ROE-4, ROE-5 y ROE-7 fueron los compuestos que presentaron esta actividad considerada como nootrópica.

En el caso de los peces expuestos a ROE-2 (3.36 ua) se observa una respuesta similar a la conducta normal y a la escopolamina, por lo que no hay diferencia significativa en caso contrario con la habituación (11.26 ua) y la combinación con escopolamina (13 ua) donde es mayor. Entre los grupos existe una diferencia estadística evaluada por ANOVA de una vía ($F_{4,39} = 36.85$) y mediante comparaciones múltiples se presenta una desigualdad estadística entre los grupos (** $p \leq 0.001$).

El efecto total de la evaluación de la conducta presentada por ROE-4 (6.88 ua) es similar a la conducta normal y escopolamina por lo que no hay diferencia significativa pero la comparación con la habituación (11.26 ua) y la combinación con escopolamina (11.71) es mayor. Entre los grupos existe una diferencia estadística evaluada por ANOVA de una vía ($F_{4,39} = 18.16$) y mediante comparaciones múltiples se presenta una desigualdad estadística entre los grupos (** $p \leq 0.001$, * $p \leq 0.01$).

En el caso de ROE-5 y ROE-7 hay diferencia de la conducta con respecto a ROE-2 y ROE-4 que presentan un efecto similar a donepezilo. ROE-5 (8.12 ua) y ROE-7 (9.28 ua), incrementa la conducta con respecto al grupo normal y donepezilo. Sin embargo, la conducta es menor al grupo que solo tiene habituación (11.26 ua). Cuando los peces son expuestos a ROE-5 y ROE-7 y escopolamina en ambos casos el efecto se aumenta a 12.05 ua y 14.82 ua respectivamente con respecto al grupo que solo fue expuesto a escopolamina (4.54 ua). Las diferencias estadísticas se calcularon por medio de ANOVA de una vía ($F_{4,39} = 34$) y mediante comparaciones múltiples se presenta una desigualdad estadística entre los grupos (** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$) (Fig. 12).



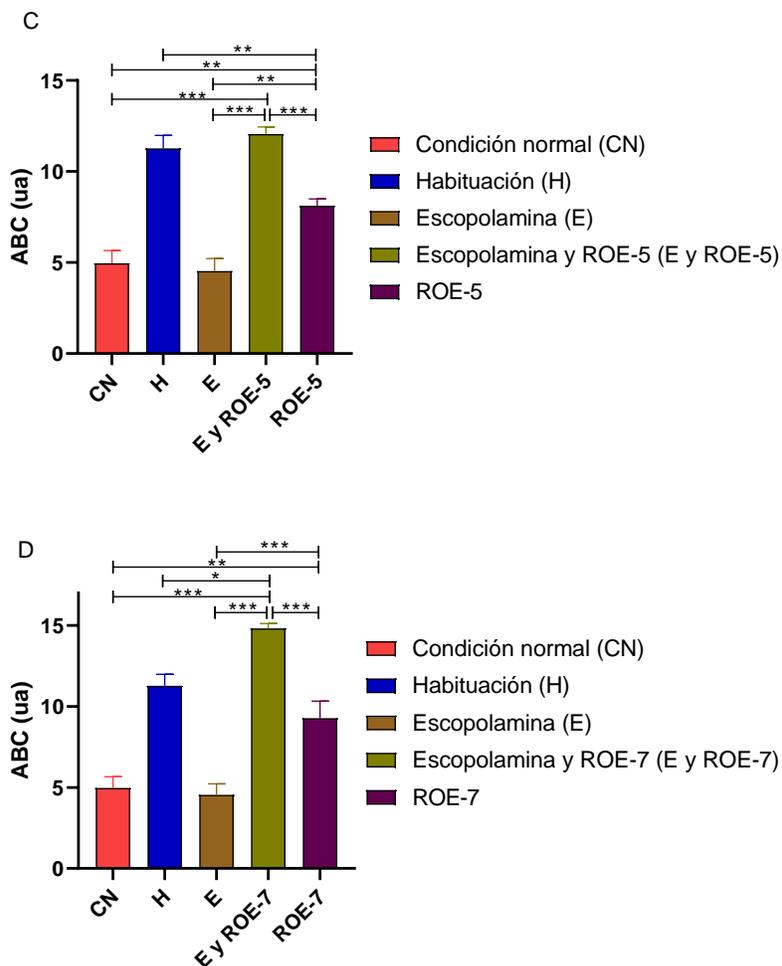


Figura 12. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y serie ROE. En cada panel se representa un compuesto híbrido en particular y se compara con la condición normal, habituación y escopolamina (200 µM). Panel A ROE-2 (1 µM). Panel B ROE-4 (2 µM). Panel C ROE-5 (2 µM). Panel D ROE-7 (0.5 µM). Cada grupo representa el promedio de 8 animales ± E.E.M. La diferencia estadística entre los grupos se determinó con una prueba ANOVA de una vía y post hoc de tukey (**p≤0.01, ***p≤0.001, *p≤0.05).

8.6.2 Compuestos híbridos de la serie ROE parecidos haloperidol

Los compuestos ROE-1 (9.63 ua) y ROE-3 (11.91 ua) presentaron un efecto similar y estadísticamente diferente con respecto a la conducta normal (4.96 ua) y grupo de escopolamina (4.54 ua). Sin embargo, cuando los peces son expuestos a estos compuestos y escopolamina se observa que no hay diferencia estadística con respecto a la exposición individual. Esta conducta es muy semejante al haloperidol en donde el efecto de escopolamina no se revierte. Las diferencias estadísticas se

determinaron mediante una ANOVA de una vía ($F_{4,39} = 13.40$) y mediante comparaciones múltiples ($***p \leq 0.001$, $**p \leq 0.01$).

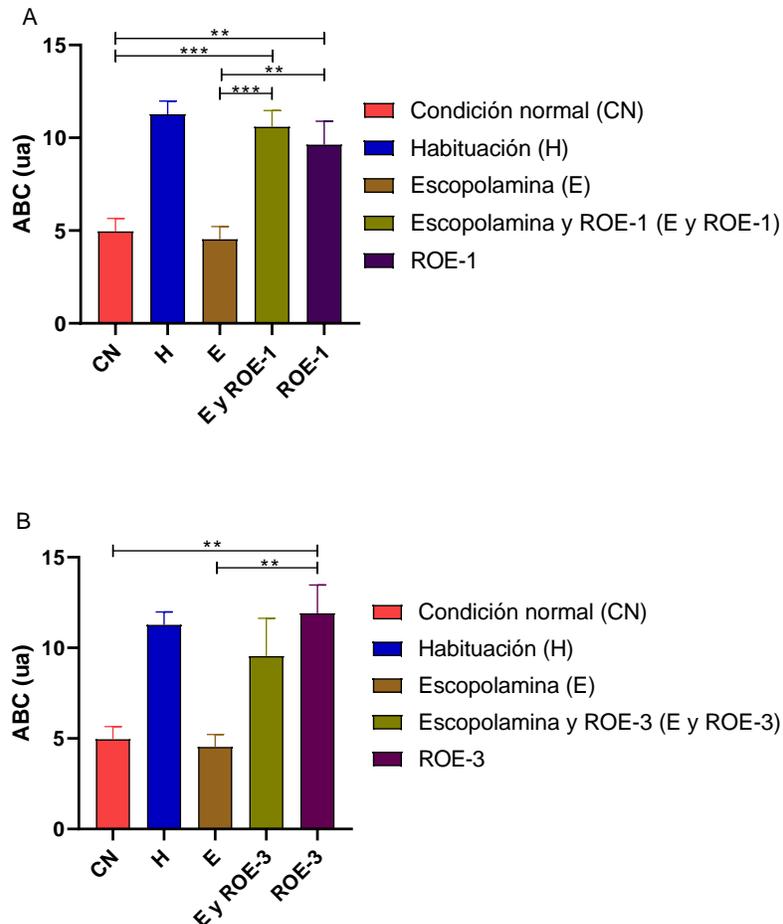


Figura 13. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y serie ROE. En cada panel se representa un compuesto híbrido en particular y se compara con la condición normal, habituación y escopolamina (200 µM). Panel A ROE-1 (2 µM). Panel B ROE-3 (2 µM). Cada grupo representa el promedio de 8 animales \pm E.E.M. La diferencia estadística entre los grupos se determinó con una prueba ANOVA de una vía y post hoc de tukey ($***p \leq 0.001$, $**p \leq 0.01$).

8.6.3 Compuestos híbridos de la serie ROE con actividad inespecífica

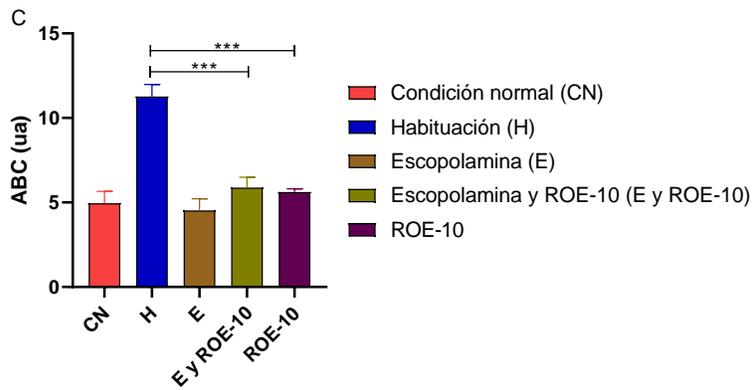
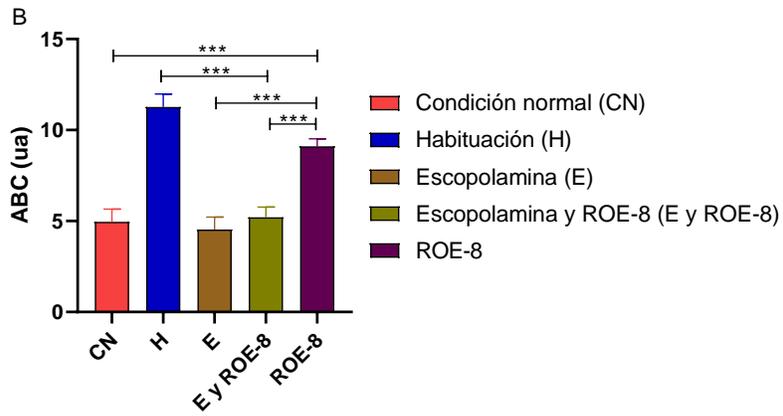
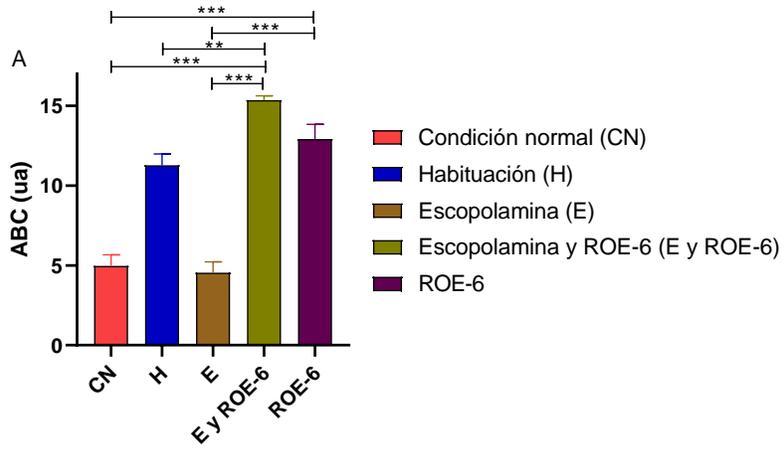
El efecto de los peces que fueron inmersos en ROE-6 (12.92 ua) es mayor al grupo de peces en la condición normal (4.96 ua) y al grupo de escopolamina (4.54 ua). Sin embargo, su comportamiento es similar a la habituación y cuando el grupo de peces que fue inmerso en ROE-6 y posteriormente en escopolamina no se encontró

diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo que solo fue inmerso en ROE-6. Una de las características más importantes a notar en este compuesto es que la conducta de los peces aumentó considerablemente, ya sea individual o con escopolamina y como no hubo diferencia no se puede clasificar dentro del grupo con efecto semejante a donepezilo ni a los que se encuentran clasificados como efecto semejante al haloperidol (Fig. 14, Panel A).

En el caso de la evaluación del compuesto ROE-8 se observó un aumento en la conducta (9.11 ua) con respecto al grupo normal (4.96 ua) y escopolamina (4.54 ua). Cuando los peces son pretratados con ROE-8 y luego inmersos con escopolamina hay una diferencia estadística entre el grupo ROE-8 individual (9.11 ua) y su combinación con escopolamina (5.21 ua), esto podría sugerir un efecto nootrópico (Figura 14, Panel B). Sin embargo, el efecto del grupo 8 no tiene diferencia con respecto a la habituación normal, por lo tanto, no hay una semejanza con el grupo de donepezilo, por lo anterior se considera como actividad inespecífica (ANOVA de una vía ($F_{4,39} = 22.94$)).

En la figura 14 se muestra que el compuesto ROE-10 (5.62 ua) es menor a la habituación (11.26 ua) y muy semejante al grupo de conducta normal. Cuando los peces que son pretratados con ROE-10 y escopolamina tienen una conducta igual que solo cuando tienen escopolamina, por lo cual no hay diferencia significativa y no existe una diferencia estadística entre ellos (ANOVA de una vía ($F_{4,39} = 19.95$)), esto sugiere que no tiene un efecto nootrópico. En la misma figura se muestra que los grupos de peces inmersos en ROE-11 (8.47 ua), ROE-12 (7.16 ua) y ROE-13 (9.21 ua) tienen un efecto mayor al grupo de la conducta normal y escopolamina.

En todos los casos no se encontró diferencia estadística cuando se combinan con escopolamina, pero estos grupos tienen un efecto semejante a la habituación. Por lo cual, pueden clasificarse con actividad no nootrópica, diferente a la conducta de los peces inmersos en haloperidol.



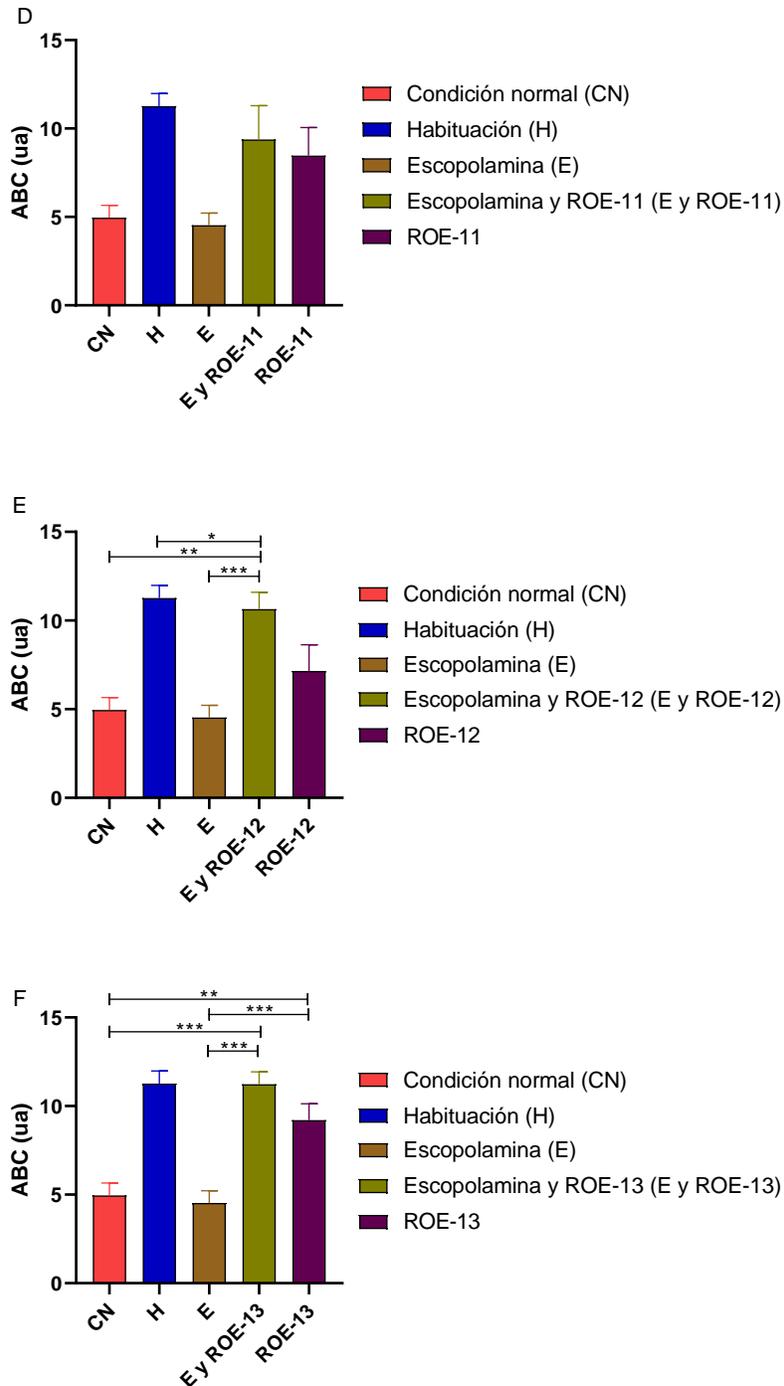


Figura 14. Área bajo la curva de la comparación de distintas condiciones y serie ROE. En cada panel se representa un compuesto híbrido en particular y se compara con la condición normal, habituación y escopolamina (200 μ M). Panel A ROE-6 (0.5 μ M). Panel B ROE-8 (0.5 μ M). Panel C ROE-10 (0.05 μ M). Panel D ROE-11 (2 μ M). Panel E ROE-12 (2 μ M). Panel F ROE-13 (0.5 μ M).

Cada grupo representa el promedio de 8 peces \pm E.E.M. La diferencia estadística entre los grupos se determinó con una prueba ANOVA de una vía y post hoc de tukey (** $p \leq 0.001$, ** $p \leq 0.01$, * $p \leq 0.05$).

IX Discusión

9.1 Comportamiento de *Danio rerio* en condición normal y habituación

La cognición es un proceso complejo que incluye varios procesos a nivel del cerebro, dada la complejidad neuronal del proceso, se utilizan modelos animales como roedores, perros y primates que permiten su estudio. En el presente estudio se utilizó una especie más sencilla neuralmente, en donde se puede identificar claramente una conducta que representa un proceso de cognición. *Danio rerio* fue sometido a un proceso de habituación en una caja de luz/oscuridad y se determinó que el pez puede aclimatarse en un periodo de 20 días a un proceso de cognición.

Esta idea se contrapone a lo reportado previamente, ya que se ha sugerido que los estudios en peces no eran adecuados para un proceso de cognición debido a su aparente estructura neurológica primitiva, sugiriendo que la conducta que presentan es simplemente intuitiva (Kalueff, 2014). Por otra parte, se ha sugerido que la evaluación de la cognición en pez cebra tiene muchas ventajas, una de ellas es el proceso de absorción de fármacos ya que las sustancias comúnmente se administran sumergiendo al pez en el tanque con una solución a una concentración específica de la sustancia para permitir que se difunda a través de las branquias hacia el torrente sanguíneo, además que la barrera hematoencefálica del pez cebra permanece más permeable, lo que permite la adecuada penetración de los fármacos que normalmente no podrían atravesarla (Meshalkina, 2017).

Se ha establecido que la relación de *Danio rerio* en un proceso cognitivo se debe a que estos animales muestran una amplia gama de funciones cognitivas pese a la ausencia del hipotálamo; estas funciones se pueden activar por pruebas de aprendizaje de habituación, distinción visual y aprendizaje espacial (Bailey, 2015). Particularmente, en este estudio se analizó un proceso de habituación, el cual consiste en que la respuesta emitida por el pez refleja como el tiempo de permanencia en la parte superior se modifica después de la habituación y su comportamiento cambia al colocarlos en el cilindro. En este proceso de habituación

los peces se adaptan a un proceso que no es dañino y conservan las características que los hacen responder a estímulos potencialmente peligrosos.

En el presente estudio los peces fueron sometidos a un proceso de habituación en una caja de luz/oscuridad y posteriormente eran sometidos a un ambiente nuevo en un cilindro de exploración. Esta prueba estaría correlacionada de acuerdo con la literatura en una prueba de novedad y se caracterizaría por el tiempo de permanencia en la parte superior del cilindro. En un proceso de habituación a la novedad se atenúan los comportamientos innatos, a medida que los peces se adaptan a la pecera luz/oscuridad se acostumbran a un entorno específico y esto refleja una conducta de memoria de trabajo espacial (Hong, 2019). Ya que cuando se habitúa a los animales entre sesiones se usa comúnmente para evaluar la memoria espacial a mediano y largo plazo (Wong, 2010). En el presente experimento se estaría evaluando un proceso de memoria espacial. Cuando se somete el pez a la habituación en la caja de luz/oscuridad el proceso de habituación puede representar construcciones neurobiológicas profundas, dando paso al proceso de la información adaptativa desarrollando un mapa cognitivo. Es importante mencionar que el deterioro de la habituación también se puede asociar con un aumento de la ansiedad por lo que es importante identificar la interacción ansiedad-memoria.

9.2 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en un cilindro con escopolamina

Una vez que se determinó que un modelo de habituación es adecuado para evaluar el aprendizaje del pez, se buscó una sustancia activa que de manera química interfiriera en la pérdida de cognición. Existen varias evidencias que demuestran que la escopolamina es un compuesto que induce la pérdida de memoria en la especie *Danio rerio* (Kim, 2010; Richetti, 2011; Braidá, 2014), en la misma línea de investigación en el presente trabajo se comprobó que la administración de escopolamina a la concentración 200 μM modifica la conducta de los peces con habituación a ruido mecánico. Un ejemplo del uso de escopolamina en *Danio rerio* en la búsqueda de compuestos y/o extractos con mejora de la actividad cognitiva es el estudio de *Hericiium erinaceus* (Bull) en donde se demostró que el extracto

etanólico mejora en la cognición debido a las propiedades antioxidantes, en este estudio se demostró que la escopolamina causa estrés oxidativo a través de la interferencia con acetilcolina en el cerebro lo que permite el deterioro cognitivo en *Danio rerio* (Valu, 2021).

Los estudios clínicos de la enfermedad de alzheimer han proporcionado evidencia clara para establecer que esta patología está relacionada con el sistema nervioso colinérgico; hay pérdida de neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal y el hipocampo. La acetilcolina funciona como el principal neurotransmisor en el sistema colinérgico, la disminución de la liberación de acetilcolina genera déficits de aprendizaje, en la patología de alzheimer se ha encontrado que los niveles de receptores de acetilcolina tanto nicotínicos como muscarínicos están reducidos (Mulugeta, 2003).

El sistema colinérgico está relacionado entonces con el aprendizaje y la memoria, así la escopolamina al ser un antagonista de los receptores muscarínicos acetilcolinérgicos puede ocasionar alteraciones en el aprendizaje y la memoria. Los resultados obtenidos en el presente estudio en donde se utilizó escopolamina 200 μM coinciden con lo previamente reportado por Brianza, en donde se cuantificó el número de entradas y tiempo de permanencia en la parte superior de un tanque después de que los peces fueron expuestos a escopolamina 100 μM , en ambos estudio se observa como escopolamina disminuye la cognición después de un proceso de habituación (Brinza, 2022).

9.3 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en donepezilo

En el presente trabajo se utilizó donepezilo como fármaco de referencia para demostrar la utilidad del modelo de pérdida de cognición por escopolamina. La escopolamina y la atropina por ser antagonistas competitivos de los receptores muscarínicos pueden alterar el aprendizaje y la memoria, entonces los agonistas de los receptores muscarínicos, como la pilocarpina pueden reducir las deficiencias inducidas por la escopolamina en varios modelos de cognición en ratón. Por otra parte, los inhibidores de AchE, como la rivastigmina, el donepezilo y la galantamina,

se han utilizado para mejorar los déficits de memoria tanto en humanos como en roedores (Chen, 2020).

El donepezilo y la fisostigmina son inhibidores de acetilcolinesterasa, estos pueden descomponer a la acetilcolina en acetil CoA y colina; esto ocasiona un aumento de los niveles de acetilcolina en la hendidura sináptica, y, en consecuencia, se mejora la transmisión colinérgica, lo que ayuda a mejorar el aprendizaje y la memoria, por ello en el presente estudio se utilizó como fármaco de referencia al donepezilo (Kim, 2010). Los datos obtenidos en el presente trabajo demuestran que el donepezilo disminuye la actividad de la pérdida de cognición inducida por escopolamina en el pez cebra, estos datos coinciden con estudios previos en donde también se utilizó donepezilo como fármaco de referencia en *Danio rerio* (Liu, 2020; Miao, 2022; Turgutalp, 2022).

9.4 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en haloperidol

El haloperidol es un fármaco antipsicótico, existen evidencias de que este fármaco puede administrarse a pacientes con alzheimer para tratar los síntomas de agitación (Mühlbauer, 2021). Sin embargo, este fármaco no está relacionado para tratar el déficit cognitivo. En general los fármacos antipsicóticos interactúan con el sistema dopaminérgico, serotoninérgico, el sistema de norepinefrina e histamina. No se sabe mucho sobre la interacción con el sistema colinérgico. En el presente proyecto se determinó que haloperidol a diferencia del donepezilo no mejora el déficit cognitivo en el pez cebra. En un estudio previo se demostró que la sulpirida, la olanzapina y el haloperidol disminuyen la actividad de la acetilcolinesterasa *in vitro*. Sin embargo, *in vivo* la sulpirida, la olanzapina no modificó la actividad de la enzima, contrariamente al haloperidol aumentó significativamente la actividad de la enzima se ha sugerido que el haloperidol podría haber aumentado las transcripciones de ARNm de acetilcolinesterasa en *Danio rerio* y entonces habría mecanismos moleculares relacionados con la señalización colinérgica inducida por el tratamiento del haloperidol (Seibt, 2009).

Por otra parte, no se tienen muchos estudios relacionados con el haloperidol en modelos de memoria del pez cebra. Pero en roedores se realizó un estudio donde

se evalúa la pérdida de cognición por administración repetida de MK-801 en el modelo de laberinto Morris y se encontró que el haloperidol no revierte la pérdida de cognición con respecto a la olanzapina que sí lo hace (Song, 2016).

Los resultados obtenidos en el presente proyecto no permiten establecer una relación entre el haloperidol y la cognición, ya que por una parte parecería ser que la administración solo de haloperidol aumenta la actividad del pez en el cilindro y cuando se realiza el pretratamiento con haloperidol y luego con escopolamina pareciera que no hay actividad en la recuperación de la cognición. Estos efectos son contradictorios porque podrían estar vinculados más a los receptores de movimiento (dopamina) que a los receptores de memoria (acetilcolina), por lo que no se puede establecer hasta este momento cual podría ser su participación en *Danio rerio* y se requieren más estudios que establezcan la relación de este compuesto con la memoria.

9.5 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en LMH-2

LMH-2 es un compuesto análogo de haloperidol, se ha demostrado que LMH-2 tiene mejor efecto antinociceptivo vía los receptores sigma-1 (Déciga-Campos et al., 2020). En el presente estudio LMH-2 mostró un efecto semejante al haloperidol y tampoco se puede sugerir que tenga una relación con la cognición comparando con respecto a donepezilo.

9.6 Efecto de la inmersión de *Danio rerio* en la serie ROE (ROE-1 – ROE-14)

La serie ROE (1-14) son compuestos nuevos sintetizados a partir de LMH-2 y donepezilo, por lo tanto, podrían tener actividad como antagonistas de receptores sigma-1 e inhibidores de acetilcolinesterasa. Los resultados obtenidos en el presente estudio se basan en la comparación del efecto observado entre los compuestos de la serie ROE y donepezilo que es el fármaco de referencia. Como se muestra en los resultados, se observa que LMH-2 al igual que el haloperidol no tienen efecto sobre la cognición, o al menos con la concentración evaluada. Por lo tanto, la actividad encontrada se deba probablemente a la inhibición de la acetilcolinesterasa como el donepezilo. Tomando estas consideraciones se determinó que ROE-2, ROE-4, ROE-5 y ROE-7 pueden tener actividad nootrópica

en *Danio rerio* también que ROE-1 y ROE-3 pueden tener un efecto semejante al haloperidol y los compuestos ROE-6, ROE-8, ROE-10, ROE-11, ROE-12 y ROE-13 presentan una actividad inespecífica.

X Conclusión

La evaluación de la actividad nootrópica de los compuestos híbridos de antagonistas de receptores sigma-1 e inhibidores de acetilcolinesterasa de la serie ROE en *Danio rerio* sugiere que ROE-2, ROE-4, ROE-5 y ROE-7 podrían tener efecto en la cognición y podrían ser compuestos con potencial actividad para el tratamiento de alzheimer.

XI Referencias bibliográficas

1. Axmacher, N. R. (2017). Cognitive Neuroscience of Memory consolidation. Switzerland: Springer cham. Obtenido de <https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/book/10.1007/978-3-319-45066-7#about-book-content>
2. Bailey, J. O. (2015). Pharmacological analyses of learning and memory in zebrafish (*Danio rerio*). *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 139, 103-111. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25792292/>
3. Braidá, D. P. (2014). A new model to study visual attention in zebrafish. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 55, 80-86. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24681194/>
4. Brinza, I. R.-K. (2022). Sweroside Ameliorated Memory Deficits in Scopolamine-Induced Zebrafish (*Danio rerio*) Model: Involvement of Cholinergic System and Brain Oxidative Stress. *Molecules*, 27(18), 5901. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36144637/>
5. Castillo, T. G. (2021). Plasma Levels of Amyloid- β Peptides and Tau Protein in Mexican Patients with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 82(1), 271-281. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34151786/>
6. Chen, W. Y. (2020). Scopolamine, a Toxin-Induced Experimental Model, Used for Research in Alzheimer's Disease. *CNS & neurological disorders drug targets*, 19(2), 85-93. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32056532/>
7. Connors, B. B. (2016). *Mecanismos moleculares del aprendizaje y la memoria*. Philadelphia: Wolters kluwer.
8. Froestl, W. M. (2012). Cognitive enhancers (nootropics). Part I: drugs interacting with receptors. *Journal of Alzheimer's disease*, 32(4), 798-887. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22886028/>

9. Hardan, L. D.-S.-Y. (2021). COVID-19 and alzheimer's disease: a literature review. *Medicina*, 57(11), 1157. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34833377/>
10. Hashimoto, K. (2017). *The NMDA receptors*. Humana Press. Obtenido de https://link-springer-com.pbidi.unam.mx:2443/chapter/10.1007/978-3-319-49795-2_1
11. Hölter, S. E.-D. (2015). Assessing Cognition in Mice. *Current protocols in mouse biology*, 5(4), 331-358. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26629775/>
12. Hong, X. Z. (2019). Fish behavior: A promising model for aquatic toxicology research. *The science of the total environment*, 686, 311-321. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31181518/>
13. Honoré, E. . (2021). Hippocampal Somatostatin Interneurons, Long-Term Synaptic Plasticity and Memory. *Frontiers in neural circuits*, 15, 1-24. Obtenido de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncir.2021.687558/full>
14. Kalueff, A. S. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trens in pharmacological sciences*, 35(2), 63-75. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24412421/>
15. Kandel, E. S. (2011). *Principios de neurociencia* (4 ed.). Mc Graw Hill. Obtenido de <https://booksmedicos.org/principios-de-neurociencia-kandel-4a-edicion/>
16. Kandimalla, R. H. (2017). Therapeutics of neurotransmitters in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease*, 57(4), 1049-1069. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27565459/>
17. Kim, Y. L. (2010). Scopolamine-induced learning impairment reversed by physostigmine in zebrafish. *Neuroscience research*, 67(2), 156-161. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20298728/>

18. Liu, Z. B. (2020). Design and Synthesis of New Benzo[d]oxazole-Based Derivatives and Their Neuroprotective Effects on β -Amyloid-Induced PC12 Cells. *Molecules*, 25(22), 5391. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33218007/>
19. López, R. R. (2022). Prevalence of Alzheimer's disease in rural and urban areas in Cuba and factors influencing on its occurrence: epidemiological cross-sectional protocol. *BMJ open*, 12(11). Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36323463/>
20. Lucon, X. M. (2014). Assessing memory in Zebrafish using the one trial test. *Behavioural Processes*, 106, 1-4. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24704579/>
21. Macrae, C. P. (2015). Zebrafish as tools for drug discovery. *Nature reviews, Drug discovery*, 14(10), 721-731. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26361349/>
22. Maurice, T. G. (2017). Sigma-1 (σ_1) Receptor in Memory and neurodegenerative diseases. *Handbook of experimental pharmacology*, 244, 81-108. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28275911/>
23. Meshalkina, D. K. (2017). Understanding zebrafish cognition. *Behavioural processes*, 141(2), 229-241. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27919782/>
24. Miao, S. H. (2022). Aaptamine - a dual acetyl - and butyrylcholinesterase inhibitor as potential anti-Alzheimer's disease agent. *Pharmaceutical biology*, 60(1), 1502-1510. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35968601/>
25. Mühlbauer, V. M. (2021). Antipsychotics for agitation and psychosis in people with Alzheimer's disease and vascular dementia. *The cochrane database of systematic reviews*, 12(12). Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34918337/>

26. Mulugeta, E. K. (2003). Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain research*, 960, 259-262. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12505680/>
27. Pohanka, M. (2012). Acetylcholinesterase inhibitors: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(8), 871-886. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22768972/>
28. Radaghdam, S. V.-K. (2021). Molecular mechanisms of sex hormones in the development and progression of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*, 764. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34500000/>
29. Rahman, F. S. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism. *Arabia saudita: Intechopen*. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/330944077_Zebrafish_Danio_rerio_as_a_Model_Organism
30. Ramakrishnan, N. (2015). Altered sigma-1 receptor expression in two animal models of cognitive impairment. *Molecular Imaging and Biology*, 17(2), 231-238. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25273321/>
31. Richetti, S. B. (2011). Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish. *Behavioural brain research*, 217(1), 10-15. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20888863/>
32. Roesler, R. S. (2011). Cognitive enhancers: focus on modulatory signaling influencing memory consolidation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 99(2), 155-163. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21236291/>
33. Seibt, K. O. (2009). Antipsychotic drugs inhibit nucleotide hydrolysis in zebrafish (*Danio rerio*) brain membranes. *Toxicology in vitro*, 23(1), 78-82. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18996465/>

34. Serý, O. P. (2013). Molecular mechanisms of neuropathological changes in Alzheimer's disease: a review. *Folia neuropathologica*, 51(1), 1-9. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23553131/>
35. Sharma, K. (2019). Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (review). *Molecular Medicine Reports*, 20(2), 1479-1487. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31257471/>
36. Singsai, K. (2021). Effect of *Streblus asper* Leaf Extract on Scopolamine-Induced Memory Deficits in Zebrafish: The Model of Alzheimer's Disease. *Advances in pharmacological and pharmaceutical sciences*. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33987539/>
37. Song, J. S. (2016). Differential Effects of Olanzapine and Haloperidol on MK-801-induced Memory Impairment in Mice. *Clinical psychopharmacology and neuroscience*, 14(3), 279-285. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27489382/>
38. Stefanello, F. F. (2019). Exploring Object Discrimination in Zebrafish: Behavioral Performance and Scopolamine-Induced Cognitive Deficits at Different Retention Intervals. 16(4), 370-378. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31145046/>
39. Thompson, R. ., (2013). *Memory*. New Jersey: Princeton University. Obtenido de <https://www-degruyter-com.pbidi.unam.mx:2443/document/doi/10.1515/9781400849482/html>
40. Tovar, K. W. (2016). Modulating synaptic NMDA receptors. *Neuropharmacology*, 112, 29-33. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27565459/>
41. Turgutalp, B. B. (2022). Discovery of Potent Cholinesterase Inhibition-Based Multi-Target-Directed Lead Compounds for Synaptoprotection in Alzheimer's Disease. *Journal of medicinal chemistry*, 65(18), 12292-12318. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36084304/>

42. Valu, M. S. (2021). *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers. Ethanollic Extract with Antioxidant Properties on Scopolamine-Induced Memory Deficits in a Zebrafish Model of Cognitive Impairment. *Journal of fungi*, 7(6), 477. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34204787/>
43. Wong, K. E. (2010). Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 208(2), 450-457. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20035794/>
44. Xia, X. W. (2021). COVID-19 and alzheimer's disease: how one crisis worsens the other. *Translational neurodegeneration*, 10(1). Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33941272/>
45. Ye, N. W. (2020). Small molecules selectively targeting sigma-1 Receptor for the treatment of neurological diseases. *Journal of Medicine Chemistry*, 63(24), 15187-15217. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33111525/>
46. Yilmaz, U. (2015). Alzheimer's disease. *Radiologe*, 55(5), 386-388. Obtenido de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25957008/>