



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

**EFFECTO DE INYECCIONES
INTRAHIPOCAMPALES DE
ERISODINA SOBRE UN
LABERINTO ELEVADO EN T**

SUSANA GRACIELA SÁNCHEZ HERRERA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO.

2022



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Efecto de inyecciones intrahipocampales de erisodina sobre un laberinto elevado en T**, realizada por la estudiante: **Susana Graciela Sánchez Herrera**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

DR. RAMÓN MARCOS SOTO HERNÁNDEZ,

CO-DIRECTORA

DRA. MARIA EUGENIA GARÍN AGUILAR

ASESORA

DRA. HEIKE VIBRANS LINDEMANN

ASESORA

DRA. MARIA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

ASESOR

DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, octubre de 2022

EFFECTO DE INYECCIONES INTRAHIPOCAMPALES DE ERISODINA SOBRE UN LABERINTO ELEVADO EN T-.

Susana Graciela Sánchez Herrera, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

RESUMEN

En plantas del género *Erythrina* se encuentra presente el alcaloide erisodina, el cual se ha demostrado que actúa como un antagonista de los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$. En este estudio erisodina se aisló de las semillas de tres diferentes especies de *Erythrina* y su estructura química se determinó por RMN- H^1 . La participación del alcaloide erisodina sobre los receptores $\alpha 4\beta 2$ se evaluó mediante una tarea de Laberinto T Elevado, cuyo procedimiento consta de dos fases (entrenamiento y prueba). Para esta investigación los sujetos experimentales fueron ratas macho de la cepa Wistar a los cuales se les insertaron bilateralmente cánulas dirigidas hacia el hipocampo dorsal. Una semana después de la cirugía y antes del entrenamiento, grupos independientes de sujetos recibieron los siguientes tratamientos: nicotina (3.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) o erisodina (3.4, 6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) o solución salina 0.9% (SAL) (1 $\mu\text{L}/\text{min}$), a un grupo adicional de animales no recibió tratamiento (INT). Pasados 30 minutos de la administración, cada rata fue colocada al inicio del brazo cerrado del laberinto T Elevado y se cronometró el tiempo en segundos en que el sujeto tardó en llegar a uno de los brazos abiertos (LB). El animal fue sacado del laberinto y colocado en su caja durante 30 segundos para repetir dos veces más el mismo procedimiento, registrándose las latencias de Evitación (EV1 y EV2) respectivamente. Por otro lado, para evaluar el Escape (ESC1), el sujeto se colocó al final del brazo abierto y se registró el tiempo que tardó en desplazarse hacia el brazo cerrado (latencia de escape). Veinticuatro horas después se realizó la prueba, colocando nuevamente a los animales en el Laberinto T Elevado para medir una evitación (EV3) y un escape (ESC2).

Los resultados muestran que en la obtención de erisodina, el mejor rendimiento se obtuvo con las semillas de *Erythrina herbacea* y el análisis por RMN- H^1 elucidó su estructura química. El modelo de Laberinto T evidenció el efecto ansiolítico de nicotina y la actividad ansiolítica dosis dependiente de erisodina. Con respecto a sus efectos sobre la memoria en la tarea, no hubo afectación con el agonista nicotínico; sin embargo, ambas dosis de erisodina la deterioraron. Erisodina y nicotina también disminuyeron el trastorno de pánico asociado al escape y deterioraron la memoria del evento aversivo. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el papel de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ en la modulación de los procesos de ansiedad y memoria.

Palabras clave: *Erisodina, receptores nicotínicos, hipocampo dorsal, memoria, ansiedad.*

EFFECT OF INTRAHIPPOCAMPAL ERSODINE INJECTIONS ON ELEVATED T-MAZE

Susana Graciela Sánchez Herrera, D.C.
Colegio de Postgraduados, 2022

ABSTRACT

Erysodine is an alkaloid found in plants of the genus *Erythrina*, which has been shown to act as an antagonist of neuronal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors. In this study erysodine was isolated from the seeds of three different *Erythrina* species and its chemical structure was determined by H^1 -NMR. The involvement of the alkaloid erysodine on $\alpha 4\beta 2$ receptors was assessed by an Elevated T-Maze task, whose procedure consists of two phases (training and testing). Male Wistar rats were used with cannulae inserted bilaterally into the dorsal hippocampus. One week after surgery and before training, independent groups of subjects received the following treatments: nicotine (3.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) or erysodine (3.4, 6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) or 0.9% saline (SAL) (1 $\mu\text{L}/\text{min}$), an additional group of animals received no treatment (INT). After 30 minutes of administration, each subject was placed at the beginning of the closed arm of the Elevated T maze and the time in seconds the subject took to reach one of the open arms (LB) was recorded. The animal was removed from the maze and placed in its box for 30 seconds to repeat the same procedure two more times, recording the avoidance latencies (EV1 and EV2) respectively. On the other hand, to assess Escape (ESC1), the subject was placed at the end of the open arm and the time it took to move towards the closed arm (escape latency) was recorded. Twenty-four hours later the test was performed, placing the animals again in the Elevated T Maze to measure avoidance (EV3) and escape (ESC2).

The results show that in obtaining erysodine, the best yield was obtained with the seeds of *Erythrina herbacea* and the H^1 -NMR analysis elucidated its chemical structure. Elevated T-Maze evidenced the anxiolytic effect of nicotine and the dose-dependent anxiolytic activity of erysodine. With respect to its effects on memory on task, there was no impairment with the nicotinic agonist; however, both doses of erysodine impaired it. Erysodine and nicotine also decreased escape-associated panic disorder and impaired memory of the aversive event.

The results obtained highlight the role of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors in the modulation of anxiety and memory processes.

Key words: *Erysodine, nicotinic receptors, dorsal hippocampus, memory, anxiety.*

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Fitoquímica del Posgrado de Botánica del Colegio de Posgraduados del Campus Montecillo, bajo la dirección del Dr. Marcos Soto Hernández y el apoyo de la beca de doctorado del CONACyT 137957. La evaluación farmacológica de erisodina se realizó en el Laboratorio de Farmacobiología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM con el apoyo de la Dra. María Eugenia Garín Aguilar.

AGRADECIMIENTOS

Al **COLEGIO DE POSGRADUADOS CAMPUS MONTECILLO Y AL POSGRADO DE BOTÁNICA** por abrirme las puertas al enorme conocimiento de las Ciencias Agrícolas.

Al **CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA**, por el apoyo para llevar a cabo esta investigación

Al **DR. MARCOS SOTO HERNÁNDEZ** por ser la gran guía en mi formación académica, por sus consejos y apoyo incondicional para culminar esta gran etapa.

A la **DRA. MARIA EUGENIA GARÍN AGUILAR**, por su apoyo incondicional, su tiempo, paciencia, ayuda y disposición para llevar a cabo esta investigación, agradezco infinitamente por todo lo que me brindo, su amistad y sus enseñanzas.

A la **DRA. MARIA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS**, por su confianza, apoyo y amistad brindada en todo momento.

A la **DRA HEIKE VIBRANS**, por sus enormes enseñanzas al maravilloso mundo de la etnobotánica durante todo el posgrado.

Al **DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ**, por la confianza y apoyo brindado en la realización de esta tesis

AL PERSONAL DEL LABORATORIO DE FITOQUÍMICA, a mi amiga Mercedes Alvarado Espinoza (Mechita), al Sr. Domingo González y a todos los que colaboran en el laboratorio.

Al **PERSONAL DEL LABORATORIO** del bioterio de la FES IZTACALA por el apoyo brindado a esta investigación.

Al **PERSONAL DEL LABORATORIO** del Campus Juriquilla de la UNAM por las facilidades para llevar a cabo esta investigación.

DEDICATORIA

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y la de toda mi familia.

A mis padres **Malena y Rodo** por ser el mejor ejemplo de vida que tengo. Su apoyo ha sido indispensable para cualquier aspecto de mi vida, cada noche miro al cielo y me doy cuenta de lo afortunada que soy por tenerlos cerca de mí.

A mis hijos **Eli y Angelito** que son el regalo más grande que Dios y la vida me pudieron dar, aunque aún no lo sepan son y serán lo más importante en mi vida, hoy he dado un paso más por ustedes, que son las personitas que más amo en este mundo. Espero que un día comprendan que les debo lo que ahora soy y que este logro es solo por ustedes. "Gracias por existir, los amo".

Gracias a **Vic**, mi esposo, amigo y compañero de vida, a quien admiro profundamente, porque has estado a mi lado compartiendo mis sueños y logros, cerca y a la distancia, juntos te amo con el corazón.

A mis hermanas **Abby y Charie** que siempre han estado conmigo en todo momento, apoyándome y alentándome y siempre JUNTAS.

A ti **tío Javi**[†] que siempre me brindaste una eterna sonrisa y cariño, sé que desde el cielo estas orgulloso de mi.

Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.

Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
LISTAS DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	3
2.1 Justificación	3
2.2 Objetivo General:	3
2.3 Objetivos Específicos:	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Distribución de <i>Erythrina</i>	4
2.2 Características botánicas del género <i>Erythrina</i>	5
2.3 Aporte nutricional	8
2.4 Ornamental	8
2.5 Otros usos	9
2.6 Etnobotánica	9
2.7 Metabolitos	11
2.8 Metabolitos secundarios	12
2.9 Clasificación de los metabolitos secundarios	13
2.10 Productos nitrogenados	13
2.11 Alcaloides y sus funciones biológicas	14
2.12 Alcaloides de <i>Erythrina</i>	15
2.13 Distribución de los alcaloides en la planta	16
2.14 Aspectos farmacológicos de los alcaloides de <i>Erythrina</i>	17
2.15 Efectos fisiológicos de los alcaloides del género <i>Erythrina</i>	18
2.16 Estudios previos realizados con los alcaloides de <i>Erythrina</i> en el SNC ...	20
2.17 El sistema límbico	23
2.18 Hipocampo	25

2.19. Concepto de transmisión química.....	27
2.20 Acetilcolina	28
2.20.1 Síntesis de acetilcolina	28
2.21 Receptores colinérgicos	29
2.22 Receptores neuronales nicotínicos de acetilcolina	30
2.23 Sitios de ligandos	33
2.23.1 Sitio ligando de ACh	33
2.23.2 Sitios de ligandos Alostéricos.....	33
2.24 Distribución de los receptores nicotínicos de ACh en el cerebro.....	34
Región cerebral.....	35
Cerebelo.....	35
2.25 Función de los receptores nicotínicos sobre el SNC	36
2.26 Aprendizaje.....	37
2.27 Memoria	38
2.28 Tipos de memoria	39
2.29 Papel que desempeñan los receptores nicotínicos en las funciones de memoria y cognición	40
2.30 Ansiedad.....	41
2.30.1 Ansiedad conductual.....	41
2.30.2 La ansiedad en neurobiología	42
2.31 El papel de los receptores nicotínicos en la ansiedad	42
2.32 Modelos conductuales	43
2.33 Modelo de laberinto T elevado.....	44
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	46
4.1 Material vegetal	46
4.2 Determinación taxonómica	46
4.3 Extracción de alcaloides	46
4.4 Separación de los alcaloides	47
4.5 Identificación de erisodina.....	47
4.5.1. Resonancia magnética nuclear (RMN-H ¹).....	47
4.6 Evaluación farmacológica (Modelo Conductual)	47

4.6.1 Animales	47
4.6.2 Cirugía	47
4.6.3 Manipulación de las ratas	48
4.7 Tratamientos y microinyección	48
4.8. Aparato	49
4.9 Procedimiento	50
4.10 Perfusión	50
4.11 Histología y verificación de ubicación de las cánulas.....	50
4.12 Análisis estadístico.....	51
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL	52
5.1 Identificación y cuantificación de erisodina	52
5.2 Resultados de la prueba conductual.....	55
5.3 Entrenamiento y pruebas de evitación	58
5.4 Escape en entrenamiento y prueba.....	63
5.4.1 Escape 1 (entrenamiento)	63
5.4.2 Escape 2 (Prueba).....	66
VI. CONCLUSIÓN.....	69
VII. LITERATURA CITADA	70

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de los receptores de ACh en el cerebro humano (tomado de Paterson y Nordberg, 2000).....	35
Cuadro 2. Contenido de alcaloides en los extractos crudos de <i>Erythrina coralloides</i> , <i>E. americana</i> y <i>E. herbacea</i>	52
Cuadro 3. Desplazamientos químicos del alcaloide erisodina	55
Cuadro 4. Media de las latencias (s) de evitación (LB, EV1 y EV2) durante el entrenamiento para cada uno de los tratamientos. La línea punteada () indica que la EV3 se llevó a cabo 24 h después del entrenamiento.....	56
Cuadro 5. Medias de las latencias de escape 1 y 2 en cada uno de los tratamientos. La línea punteada () indica que el ESC2 se realizó 24 h después del entrenamiento.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caracteres taxonómicos de la especie tipo <i>Erythrina corallodendron</i> L. (Dibujo de Ángel Donati (AHMUHNAC, RES.2, vol. 3, Tab. 347)).	4
Figura 2. Distribución del género <i>Erythrina</i> en el mundo (tomado de Velásquez <i>et al.</i> , 2019).	5
Figura 3. Árbol de <i>Erythrina coralloides</i> (tomado de researchgate.net)	6
Figura 4. Flores de <i>Erythrina americana</i> (tomada en Tepatepec Hidalgo)	6
Figura 5. Frutos y semillas del género <i>Erythrina</i> sp. (Tomada de davesgarden.com)	7
Figura 6. Esqueleto Eritrinano	15
Figura 7. Estructura de los alcaloides diénicos.	15
Figura 8. Estructura de los alcaloides alquénicos.	16
Figura 9. Estructura de los alcaloides lactónicos.	16
Figura 10. Componentes estructurales y funcionales del sistema límbico (tomado de: general.rau.ac.za).	24
Figura 11 Áreas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo (Tomado de https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/82472/1/TG01749.pdf).	25
Figura 12. Capas del hipocampo. DG: Giro dentado; mol, capa molecular; lac: <i>stratum lacunosum</i> ; rad: <i>stratum radiatum</i> ; pyr: capa celular piramidal; so: <i>stratum oriens</i> (tomada de Hilton <i>et al.</i> , 2013).	27
Figura 13. Estructura de la acetilcolina.	29
Figura 14 Receptores nicotínicos de la Acetilcolina (Tomado de http://pharmacologycorner.com/acetylcholine-receptors-muscarinic-and-nicotinic/).	31
Figura 15. Subunidades de los receptores nicotínicos (Tomado de https://basicmedicalkey.com/acetylcholine-receptor-agonists-2/)	33
Figura 16. Laberinto T elevado (Tomado de sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0149763414000608)	45
Figura 17. Cirugía estereotáxica de rata	48

Figura 18. Laberinto en T. elevado (tomado de https://www.medicalexpo.es/prod/mazeengineers/product-125279-908563.html).....	49
Figura 19. Espectro de RMN¹H para el alcaloide erisodina.	54
Figura 20. Latencias de retención (s) de los tratamientos en Línea Base (LB) y Evitaciones (EV1, EV2 y EV3) durante el entrenamiento y prueba en una tarea de laberinto T elevado.....	58
Figura 21. Latencias de retención de los tratamientos escape en el entrenamiento y prueba en una tarea de laberinto T elevado.	64

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, en todo el mundo se ha incrementado el interés por el estudio de las plantas medicinales. El uso tradicional de medicamentos a base de plantas era la regla durante toda la historia de la humanidad. Se ha reconocido que es un complemento eficaz a la medicina moderna, y puede ser aceptado por las autoridades de éste ámbito (OMS, 2000).

La OMS establece como medicina tradicional al “Conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales” (OMS, 1991).

Las prácticas que se hacen en la medicina tradicional varían en gran medida de un país a otro y de una región a otra, misma que se ha influenciado por la cultura, las costumbres, los recursos naturales disponibles y la filosofía de los pueblos que las utilizan incluyendo la experiencia de los habitantes y los conocimientos transmitidos de generación en generación. Este conjunto de conocimientos proporciona la seguridad y eficacia a la práctica de la medicina tradicional. La investigación científica puede proporcionar evidencia de soporte, sin minimizar el conocimiento y experiencia que se han adquirido a lo largo de los siglos de las prácticas establecidas (OMS, 2000).

La mayoría de la población utiliza o ha utilizado plantas medicinales para la prevención o alivio de ciertas enfermedades o padecimientos (Sagera 1991); sin embargo recalca que es importante estudiar las propiedades que estas plantas poseen así también de las reacciones que éstas pudieran ocasionar debido a los componentes que poseen.

En los últimos años, la herbolaria ha sido particularmente revalorada y promovida en nuestro país. El principal enfoque que se le ha dado es sobre la aplicación en enfermedades; es también una práctica que sigue tan arraigada en nuestro pueblo desde hace mucho tiempo (Nakagawa, 1991).

En México hay cerca de 4500 especies que son utilizadas en una gran variedad de

tratamientos fitoterapéuticos y que forman parte de la herbolaria tradicional mexicana. Por ello nuestro país actualmente tiene el segundo lugar a nivel mundial en cuanto al número de plantas medicinales utilizadas (Martínez, 1996; Barragán, 2006). Debido al uso de estas plantas, en algunos países subdesarrollados y desarrollados se ha incrementado el uso y la comercialización de fitofármacos y productos naturales (Chávez y Roldán, 1994), y muestra de ello es el gran aumento en la demanda mundial por estos productos.

Existen plantas que desde tiempos antiguos han sido utilizadas en la medicina tradicional. Entre estas plantas se encuentran las de género *Erythrina*, y que en México se encuentran representando a un gran número de especies. Por ello se requiere realizar un trabajo de tipo fitoquímico y farmacológico a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) ya que las investigaciones en estas áreas son escasas.

II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

2.1 Justificación

El alcaloide erisodina es un antagonista nicotínico competitivo de receptores acetilcolinérgicos que presenta siete veces más afinidad al receptor neuronal subtipo $\alpha 4\beta 2$, lo que lo convierte en una herramienta auxiliar en la caracterización funcional de estos receptores. Los receptores $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo dorsal participan de manera significativa en el proceso de consolidación de la memoria; por ello, se esperaría que la administración de erisodina en el hipocampo dorsal produzca mayor deterioro en la retención, que la observada con la administración de antagonistas con menor afinidad a estos receptores como DH β E.

Por otro lado, existen evidencias que las estructuras cerebrales implicadas en la modulación de la memoria y en la ansiedad se superponen (Tomaz *et al.*, 1992). El modelo de laberinto T elevado, tiene como ventaja evaluar en la misma prueba los efectos de los fármacos sobre la ansiedad y la memoria (Viana *et al.*, 1994).

En esta investigación se plantea el siguiente objetivo general y los subsecuentes particulares:

2.2 Objetivo General:

Evaluar el efecto de la administración de erisodina en el hipocampo dorsal de ratas entrenadas en el Laberinto T Elevado

2.3 Objetivos Específicos:

- Aislar el alcaloide erisodina a partir de semillas de especies del género *Erythrina*.
- Identificar y cuantificar mediante técnicas espectroscópicas el alcaloide erisodina.
- Analizar el efecto ansiolítico de la erisodina y su efecto en la memoria y la ansiedad en un modelo conductual de Laberinto en T Elevado.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Distribución de *Erythrina*

El género *Erythrina* pertenece a la subfamilia Papilionidae de la familia de las Leguminosas (Fabaceae) (Krukoff y Barneby, 1974; Neill, 1988). Fue Carl Linneo en 1753, quien describió y caracterizó a la especie *Erythrina corallodendron* (especie tipo), de acuerdo a la forma que las plantas presentan los verticilos de la flor (cáliz, estandarte, alas y quilla) (Figura 1).



Figura 1. Caracteres taxonómicos de la especie tipo *Erythrina corallodendron* L. (Dibujo de Angelo Donati (AHMUHNAC, RES.2, vol. 3, Tab. 347)).

Se conocen cerca de 113 especies (Neill, 1993), éstas especies se distribuyen en las regiones tropicales, subtropicales y en zonas templadas en el mundo. De acuerdo a Neil (1993) y Granados y colaboradores (2005), existen cerca de 70 especies que se distribuyen en América, 31 especies en el continente africano, y aproximadamente 12 especies en Asia y Oceanía (Figura 2). Se presentan en una amplia variedad de hábitats, que van desde el bosque tropical lluvioso y desiertos áridos hasta bosques montañosos con altitudes superiores a los 3000 msnm. La mayoría son árboles, algunos son arbustos y hierbas perennes con raíces leñosas.

En México, se tienen registrados aproximadamente 27 especies las cuales se distribuyen en zonas tropicales calientes y templados y algunas otras en las regiones áridas.



Figura 2. Distribución del género *Erythrina* en el mundo (tomado de Velásquez *et al.*, 2019)

2.2 Características botánicas del género *Erythrina*

Las especies de *Erythrina* tienen ciertas características botánicas con las que pueden identificarse fácilmente en el campo. Alcanzan una altura entre 4 y 12 metros, su tallo es color amarillento e irregular y sus ramas espinosas (Figura 3). Las hojas son pinnadas y trifolioladas, alternas con hojuelas de 10 cm de largo, casi cordiformes o deltoideas y en la mayoría de los casos glabras o pubescentes, provistas de estípulas, generalmente se oscurecen al secar. Los folíolos tienen forma romboides, así como ovados, elípticos o suborbiculares, el ápice es agudo, acuminado u obtuso, la base obtusa, truncada o aguda, margen entero, pubescentes o glabros, presenta tricomas simples y en ocasiones pueden ser dendritico-equinoides (Granados *et al.*, 2005).



Figura 3. Árbol de *Erythrina coralloides* (tomado de researchgate.net)

Su follaje frondoso y caduco es verde claro. La palabra *Erythrina* proviene del griego *Erythros* el cual hace referencia al color rojo que poseen las flores. En ocasiones se ven ejemplares únicamente con flores terminales de verticilos pentámeros o tetrámeros con cáliz y corola, los cuales son de color rojo vivo y se producen en conjuntos terminales cónicos. Constan de un estambre largo aproximadamente de 6 cm y otros 9 fusionados. Las alas y la quilla son pequeñas (1 cm) de color blanquecino. El gineceo está rodeado en su base por un nectario y consta de un ovario alargado, comprimido con un estilo simple que termina en un estigma pequeño (Figura 4) (Granados *et al.*, 2005).



Figura 4. Flores de *Erythrina americana* (tomada en Tepatepec Hidalgo)

El fruto que poseen las especies de *Erythrina* es una vaina con estrechamientos a lo largo de la misma que limitan a los compartimientos donde se encuentran las semillas. Estas semillas poseen un color rojo vivo, rojo escarlata o en ocasiones de color naranja muy brillantes, la testa de la semilla es lisa y carece de endospermo (Figura 5).



Figura 5. Frutos y semillas del género *Erythrina* sp. (Tomada de davesgarden.com)

Algunos autores (Ariza *et al.*, 2010; Grados y Peláez, 2012; Corado y Escobar, 2013; Aguirre *et al.*, 2015; López *et al.*, 2016) hacen mención del uso de la madera que es empleada para la elaboración de casas, algunos muebles y también como combustible o leña.

En cada región se le ha nombrado de diferentes maneras de acuerdo a Aguilar y Zolla (1982). Algunos de los nombres con los cuales se ha nombrado a este género son coral tree (en inglés), equemite (Puebla), coralina (Baja California), colorín (Tlaxcala), chocolín (Hidalgo), madre del cacao (Tabasco), patol (Veracruz), zompantli (Estado de México, Guerrero y Tlaxcala).

2.3 Aporte nutricional

La FAO consideró a este género en el listado de las especies más importantes en la seguridad alimentaria. Es una especie que aporta proteínas, minerales, carbohidratos y fibra, los cuales ya que se ha demostrado son de importancia en la dieta humana y en la dieta animal, (Zavaleta *et al.*, 2010; Guevara *et al.*, 2014; Ashfod *et al.*, 2017).

El valor nutritivo de algunas plantas de *Erythrina*, se ve afectado por las condiciones ecológicas varía con la estación, la edad, el tipo de suelo, entre otros factores (Romeo y Bell, 1974). Sotelo y colaboradores en 1993, señalaron que las semillas detoxificadas de las especies *E. breviflora* y *E. americana* contienen una alta cantidad de proteínas (38.5 y 42.5% respectivamente) e indicaron que éstas presentan un balance de aminoácidos satisfactorio para ser utilizadas como suplemento alimenticio en forrajes. Adicionalmente contienen 0.1 y 0.3% de grasa. La cantidad de alcaloides es inversamente proporcional al contenido de aminoácidos, lo cual indica que cuando existe una mayor cantidad de aminoácidos, la cantidad de alcaloides es menor (Romeo y Bell, 1974).

Se usa en alimentación animal para bovinos, ovinos, caprinos, porcinos y en la producción acuícola. A menudo se procesa como ensilaje, en el cual hay una fermentación del forraje y ocasionalmente también de los frutos (vainas y semillas), esto con la finalidad de aumentar la biodisponibilidad. Como resultado de ello en el sector pecuario se genera una mayor rentabilidad (Guzmán, 2010; Meza *et al.*, 2014; Aguirre *et al.*, 2015; López *et al.*, 2016; Montero, 2016; López y Briceño, 2017).

2.4 Ornamental

Por la belleza de sus flores las plantas del género *Erythrina* han sido utilizadas como ornamentales en calles, jardines y parques de grandes ciudades del trópico y subtropical. En la Ciudad de México especies como *E. americana* y *E. coralloides* adornan las calles de la ciudad y en Paraguay es usada *E. falcata* para este mismo fin. Las semillas son empleadas para elaborar artesanías, como collares, pulseras, aretes. También por la suavidad de la madera se elaboran algunos instrumentos musicales de acuerdo a la cultura de cada localidad.

2.5 Otros usos

Además de los anteriores usos, las plantas *Erythrina* se utilizan como cercas vivas delimitando los predios o terrenos. También se establecen como cultivo para la recuperación de algunos suelos y es común la introducción de estas especies en sistemas del tipo agroforestales y silvopastoriles.

Debido a las características biológicas, diversos autores (Vijaya *et al.*, 2008; Villanueva *et al.*, 2008; Gagliardi, *et al.*, 2015; Farfán *et al.*, 2016) hacen mención de que las plantas de *Erythrina* son resistente a los cambios bruscos de temperatura y pH, así como a las inundaciones y sequías. Las plantas actúan en la fijación del nitrógeno, aportan grandes cantidades de biomasa y además tienen la característica de tolerar altas concentraciones de metales como el aluminio. Además de ello Buttgenbach y colaboradores en 2012, reportaron que algunas especies como *Erythrina ulei* incrementan rápidamente el diámetro del tronco de forma anual, lo cual hace que esta especie se utilice en la recuperación de bosques premontanos. Son una excelente opción en la fijación de dióxido de carbono atmosférico y así ayudar a mitigar los efectos del cambio climático. Debido al color llamativo de las flores y semillas, éstas atraen una gran diversidad de aves, mariposas y abejas, lo cual hace que haya un aumento en la polinización de las especies que se encuentran asociadas (Aguilar y Aguilar, 2011; Farfán, 2012; Ventrichi, 2014; Cárdenas, 2016).

2.6 Etnobotánica

Las especies del género *Erythrina* (Leguminosae), han sido fuente de diversos estudios gracias al alto contenido de proteínas de las semillas, como se mencionó en la sección anterior. Éste género contiene metabolitos secundarios que le confieren diversas propiedades biológicas. Estos metabolitos son fenoles, alcaloides o lecitinas (Pino *et al.*, 2004; Bonilla, 2013).

En la medicina tradicional las plantas de *Erythrina* tienen diversos de usos y dependiendo de la región se utilizan para padecimientos como en quemaduras del arco del pie, abscesos o úlceras, el tratamiento contra las hemorroides, e inclusive para tratar enfermedades como la malaria, sífilis o gonorrea. Así también controlan

trastornos menstruales y migraña, disminuyen diarrea, lepra y hepatitis, en afecciones dérmicas, infecciones urinarias, lesiones de ojos y garganta. También se emplea como diurético, para eliminar algunas inflamaciones y parásitos, para disminuir la glucosa, como anticonceptivo, y tiene propiedades sedativas, analgésicas, antisépticas pero también se le considera una especie tóxica (Pino *et al.*, 2004; Mass y Campanera, 2011; De Araújo *et al.*, 2012; Escamilo, 2012).

Las especies que sobresalen por su uso más frecuente son *Erythrina variegata* L., *E. abyssinica* Lam, *E. indica* Lam, *E. fusca* Lour, y *E. senegalensis* DC (Rageau, 1973). Así mismo entre los órganos vegetales que más se utilizan con fines medicinales son las hojas y la corteza de *Erythrina* (33% y 31% respectivamente), otros órganos vegetales como raíces, semillas y flores son utilizados por la población, con menor frecuencia (12, 10 y 8%, respectivamente). Además de ello, se utilizan otras partes de la planta como las ramas, el fruto y ocasionalmente también la planta completa. Excepcionalmente también la savia de *Erythrina variegata* se ha utilizado para tratar padecimientos de infertilidad en la mujer.

Existen cerca de 60 trastornos diferentes que son tratadas con diversas especies del género *Erythrina* entre ellas están aliviar dolores (7%); mitigar infecciones urinarias y respiratorias, curar infecciones de los ojos, piel y garganta (7%), controlar la fiebre (6%), curar heridas (5%), contra los trastornos menstruales (5%) y entre otras (Pino *et al.*, 2004).

En 1943, Rivera reportó que en México, específicamente en Veracruz, las hojas de *E. americana* se utilizan contra las úlceras y abscesos, además de curar las picaduras de insectos; para desinflamar brazos, piernas, cabeza y ojos se utilizan los frutos molidos. El autor menciona que también en la Huasteca de México, la corteza se utiliza como un anticonceptivo la cual se toma hervida 40 días después del nacimiento de los niños, así también en esta región se usa contra el insomnio la infusión de las flores inmaduras. En Guerrero se combate la malaria utilizando infusiones de toda la planta

En Sonora los habitantes de la etnia Seri utilizan una infusión de las hojas de *E. standleyana* para controlar la diarrea, para las hemorragias nasales y dolores de muela.

En Durango, las semillas de *E. flabelliformis* son utilizadas para mitigar el dolor de muelas (Hastings, 1990).

La corteza de otras especies como *E. crista-galli* se utiliza en Paraguay contra el dolor de huesos, además de inducir el sueño (Hastings, 1990). De acuerdo a Mass y Campanera (2011), en Guatemala, se utiliza el tallo de *E. berteriana* como hipnótico. Las flores en infusión se emplean como sedantes y para contralar los nervios, además para detener las hemorragias y la disentería. La corteza cocida en agua se utiliza como antiséptico y micótico.

En Colombia se eliminan animales no deseados con el uso de las semillas de *E. folkersii* y como diurético. Las flores se usan contra las afecciones del tórax y producen somnolencia cuando se consumen; las raíces como sudoríferos, y la cocción de toda la planta se usa contra el apendicitis (Hastings, 1990).

2.7 Metabolitos

Existen sustancias que se encuentran en las plantas, las cuales tienen propiedades diversas, y en ocasiones la fisiología y el papel fisiológico que juegan en ella aun es desconocido. Estas sustancias pueden clasificarse en dos grupos los metabolitos llamados primarios y los secundarios.

Los primarios son los metabolitos vitales en el desarrollo de la planta y se encuentran en grandes cantidades. Su extracción es relativamente fácil extracción y su aprovechamiento es relativamente económico (Buchanan *et al.*, 2000).

Las plantas emplean carbono y energía a la producción de moléculas orgánicas que al parecer no tienen relación en reacciones como fotosíntesis, respiración, transporte de los solutos o en la producción de moléculas como, carbohidratos, proteínas y lípidos. A estas sustancias se les conoce como metabolitos secundarios o productos secundarios y se encuentran en cantidades menores.

El metabolismo de una planta ya sea primario o secundario, es un todo que se integra en un programa de desarrollo de la planta, el cual se encuentra regulado en su expresión genética. Esto implica que cada uno de los pasos del metabolismo se

expresará solamente en un estado y tiempo de desarrollo definido en la planta. De acuerdo a Ávalos y Pérez-Urria (2009) “La diferencia entre metabolitos primarios y metabolitos secundarios es solo funcional, por lo que la divergencia entre las vías bioquímicas es difusa, ya veces un compuesto es considerado un metabolito primario, pero por la acción de una sola enzima se convierte en lo que se considera un metabolito secundario”.

Ocasionalmente alguna sustancia que se considera como metabolito primario se puede transformar en uno secundario gracias a la acción de alguna enzima, por otro lado existen metabolitos secundarios que intervienen en funciones vitales de las plantas (Valencia, 2013).

2.8 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios están distribuidos en solo algunos grupos del reino vegetal y no en todos. Estas sustancias se producen en cantidades muy pequeñas y no en todos los órganos de la planta de forma generalizada. Además es frecuente que su producción sea restringida únicamente a un determinado género, a una familia, o inclusive a solo algunas especies (Ávalos y Pérez-Urria, 2009).

El ser humano ha utilizado a los metabolitos secundarios en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Muchos de estos metabolitos los utilizo en la medicina para mitigar y combatir enfermedades. Actualmente, con estas sustancias se producen medicamentos, aromas, cosméticos resinas, colorantes, saborizantes, drogas adictivas, insecticidas y potenciadores de sabor (Salisbury y Ross, 1992). El papel metabólico primordial que se le confiere a estos metabolitos es la protección al ataque de animales herbívoros y protección contra las infecciones que producen virus y bacterias, además, tienen la función de actuar como atrayentes a insectos polinizadores y como agentes de competencia entre planta y planta (Azcón-Bieto y Talón, 2000). La síntesis y producción de metabolitos secundarios es dependiente de la etapa de desarrollo en la cual se encuentra la planta y el incremento en la cantidad de ellos depende del estrés abiótico o biótico al cual estén sometidos. El aumento en la cantidad de los metabolitos secundarios se relaciona directamente con la sobrevivencia de las plantas, debido a

que la síntesis y producción proviene del metabolismo primario y en ocasiones algunas sustancias pueden llegar a ser tóxicas aun para la misma planta. Es por ello, que algunos metabolitos secundarios emiten respuestas contra heridas y daños que les produzca el ataque de plagas (Sepúlveda *et al.*, 2003).

2.9 Clasificación de los metabolitos secundarios

La clasificación de los compuestos secundarios se basa en los siguientes criterios: estructura química, la acción biológica, el origen biogenético, y la actividad farmacológica (Pedrozo, 2004). De acuerdo la clasificación de Taiz y Zeiger (2006), los metabolitos secundarios se clasifican en: productos nitrogenados, productos fenólicos y terpenoides.

Entre estos metabolitos secundarios se encuentran los alcaloides, los cuales se definen como compuestos químicos con carácter básico o alcalino que contienen uno o más átomos de nitrógeno; generalmente poseen un anillo heterocíclico y presentan acción fisiológica en animales y en el ser humano. Entre los metabolitos secundarios con nitrógeno en su estructura están los alcaloides, glucosinolatos, aminoácidos, amins, y glucósidos cianogénicos. Aquellos que no contienen nitrógeno (llamados no nitrogenados) pueden clasificarse en terpenoides, poliacetilenos, policétidos, compuestos fenólicos y fenilpropanoides (Sepúlveda *et al.*, 2003).

2.10 Productos nitrogenados

De acuerdo con Sajc *et al.* (2000), entre los metabolitos secundarios nitrogenados se encuentran los alcaloides y los glucósidos cianogénicos. Los alcaloides pertenecen a un grupo de sustancias con aproximadamente 4000 estructuras conocidas comerciales. Muchos de estos alcaloides como la cocaína, nicotina o morfina actúan en personas y tienen una actividad fisiológica activa generan un gran interés en la industria farmacológica. Por otro lado, “posiblemente los glucósidos cianogénicos se consideran los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa” (Bennett y Wallsgrove, 1994).

Villar, 1999 hace referencia que la unidad estructural básica de las proteínas, alcaloides y purinas que son los aminoácidos. La biosíntesis de los alcaloides se basa en las reacciones que se llevan a cabo entre algunos aminoácidos y otros metabolitos como acetato o mevalonato. Por ello, se genera una diversidad de estructuras que da lugar a todos los tipos de alcaloide que se conocen.

Los alcaloides presentan características en común, pero además de ello son sustancias con moléculas orgánicas de estructuras más o menos complejas, que presentan un heterociclo con uno o más átomos de nitrógeno; la síntesis de ellos se produce inicialmente a partir de los aminoácidos o de sus derivados inmediatos y que presentan con cierta toxicidad, actuando sobre todo en el sistema nervioso central (Azcón-Bieto y Talón, 2000).

Existen cerca de 27 000 alcaloides que son extraídos de plantas, organismos marinos, hongos o de algunos mamíferos. Cerca de 22 000 alcaloides se derivan de las plantas, y específicamente de 7231 especies de 186 familias. Existen más de 153 familias que aún quedan por estudiar (Mitaine-Offer *et al.*, 2002).

2.11 Alcaloides y sus funciones biológicas

Las funciones biológicas de los alcaloides dentro de las plantas no están bien definidas, pero está claro que no son producidos en las plantas para una única función. Algunas de las funciones biológicas de los alcaloides son:

1. Reservas de las sustancias para suplir el nitrógeno.
2. Productos finales del mecanismo de detoxificación.
3. La producción de alcaloides como agentes de defensa o disuasorios alimentarios.
4. Estimulantes o reguladores en las plantas, ejemplo de ello son algunos alcaloides que inhiben el crecimiento de plántulas de centeno y cebada, y otro es la colchicina que inhibe la división celular.
5. Reservas para la síntesis de proteínas.
6. Inhibidores de las actividades enzimáticas (Merillon y Ramawat, 1999).

2.12 Alcaloides de *Erythrina*

Los alcaloides de *Erythrina* han sido estudiados desde muchos puntos de vista. Entre estos estudios destacan aquellos que tienen relación con la biosíntesis y farmacología así como en la elucidación de estructuras nuevas (Barakat *et al*, 1977; Chawla y Jackson, 1989). Carmack y colaboradores (1951), identificaron la estructura del esqueleto base de los alcaloides de *Erythrina* llamado eritrinano. Más adelante se evidenció la existencia de otros dos grupos de alcaloides, un grupo de aquellos que presentan un anillo lactónico y otro grupo con los alcaloides de un anillo aromático, en lugar del lactónico.

Los alcaloides de *Erythrina* son del tipo isoquinolítico ya que presentan un esqueleto base denominado eritrinano, el cual estructuralmente es una espiroamina tetracíclica (Figura 6).

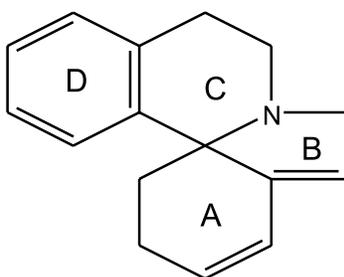


Figura 6. Esqueleto Eritrinano

Los alcaloides diénicos contienen un sistema dieno conjugado en los anillos A y B (Fig. 7).

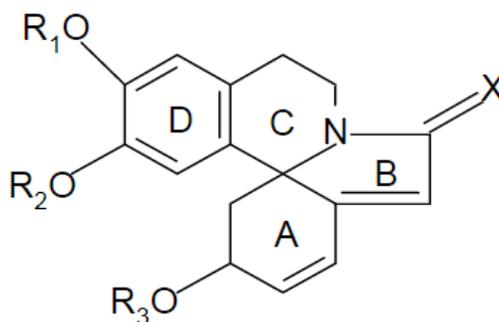


Figura 7. Estructura de los alcaloides diénicos.

Los alcaloides alquénicos presentan una insaturación 1,6 en el anillo A (Fig. 8).

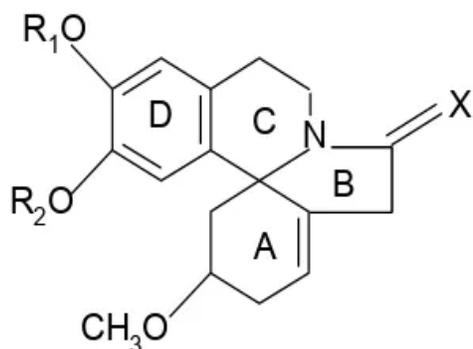


Figura 8. Estructura de los alcaloides alquénicos.

Alcaloides lactónicos, en esta clasificación se incluyen a los que presentan una lactona insaturada en lugar del anillo aromático D (Fig. 9).

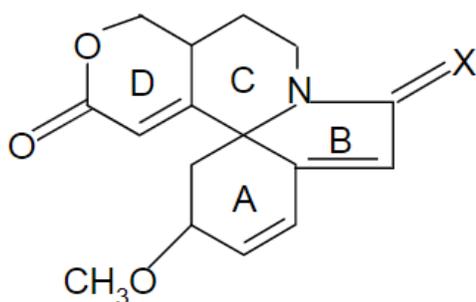


Figura 9. Estructura de los alcaloides lactónicos.

Existen alcaloides de *Erythrina* que no corresponden a los anteriores como la hipaforina, la N-nororientalina y la eribidina. Entre los alcaloides que han sido aislados del género *Erythrina* están: erisovina, erisodina, erisotrina, eritralina, glucoerisopina, erisotiovina, α y β eritroidina, eritrocoraloidina, eritratina, eritramina, erisotiopina, coraloidina entre otros (Hargreaves *et al.*, 1974).

2.13 Distribución de los alcaloides en la planta

Los alcaloides se presenta en toda la planta y no se localizan en los tejidos específicos. Las semillas son las estructuras vegetales en donde existe la mayor concentración de ellos y representan más o menos el 1%. El contenido de los alcaloides varía entre las

especies, entre los individuos de una misma población y en la temporada del año, debido a las características locales, ambientales e inclusive al tipo de suelo (Aguilar *et al.*, 1981).

Los alcaloides se encuentran presentes en la planta de dos formas; en forma libre o conjugada como glucósidos fenólicos. Los alcaloides libres pueden ser obtenidos directamente de la extracción, mientras que los conjugados necesitan ser hidrolizados en medio ácido para aislarlos (Scalabrin, 1984).

2.14 Aspectos farmacológicos de los alcaloides de *Erythrina*

Los alcaloides que se han encontrado en las especies del género *Erythrina* son de interés debido a la acción farmacológica que poseen. En el siglo XIX, se descubrió la acción paralizante de los extractos de la semilla de *Erythrina*, observando un efecto semejante al del curare. Francisco Río de la Loza, fue el primer estudioso de estas sustancias y le dio el nombre de eritrocoraloidina (Lozoya y Lozoya, 1982). Fernando Altamirano en 1888, aisló otro alcaloide responsable del efecto curarizante al cual le llamó coraloidina. Encontró que paralizaba los nervios motores cuando se administra de forma intravenosa, pero este efecto es poco marcado de forma oral. Folkers y Major (1937) estudiaron la coraloidina en el género *Erythrina*, realizando la separación de la misma. Encontraron que eran de dos alcaloides isómeros que denominaron como α y β - eritroidina (Goodman y Gilman, 2006). El Dr. Prieto investigó la corteza de *Erythrina* y halló diversos componentes; una resina neutra, algunas sales, un alcaloide y dos sustancias coloridas, una roja y otra amarilla (Lozoya y Lozoya, 1982).

En 1939, son presentados nuevos hallazgos los cuales demuestran la existencia de alcaloides en 28 especies de *Erythrina* los cuales poseen un efecto semejante al curare. Actualmente no se conocen especies de *Erythrina* que no posean alcaloides con actividad paralizante. Se ha encontrado una amplia variación en la toxicidad de las semillas de las diferentes especies y una uniformidad de la actividad paralizante de los alcaloides en animales de laboratorio.

Willaman y Bernice (1961) indican que se han investigado 59 especies diferentes de *Erythrina* y que de ellas se han aislado 13 alcaloides, los cuales, a excepción de la

hipaforina, tienen semejanzas estructurales y farmacológicas. No se han detectado todos estos alcaloides en una sola especie, pero en *E. glauca* Willd se han identificado 10 alcaloides en la semilla (Leyva, 1988). Un estudio comparativo realizado por Guerrero en 1980, hace mención que *Erythrina americana* es dos veces más tóxica que *Erythrina brevipflora*.

2.15 Efectos fisiológicos de los alcaloides del género *Erythrina*

Debido a la estructura química que presentan Evans (1991) menciona que hay gran diversidad entre los alcaloides. Los efectos farmacológicos y fisiológicos que presentan son distintos. Muchos de estos alcaloides actúan sobre el sistema nervioso central causando parálisis, otros más elevan o disminuyen la presión sanguínea, presentan propiedades analgésicas, anticolinérgicas, antidepresivas, antimaláricas, antitumorales, estimulantes nerviosos, narcóticos, tranquilizantes o relajantes musculares (Pelletier, 1983).

Los alcaloides como el curare son ineficaces por vía oral y su índice terapéutico es bajo. Los alcaloides más activos del curare son las sales de amonio cuaternarias, por lo que se ha encontrado una actividad curarizante. Los alcaloides del tipo eritriano que bloquean la transmisión mioneural de los impulsos al músculo esquelético, y posteriormente se produce la muerte por parálisis respiratoria (Burger, 1960). Los alcaloides son menos tóxicos en dosis terapéuticas, y que normalmente se utilizan para aumentar relajación muscular cuando se inhala un anestésico ligero, se emplean para mantener un paciente en estado de inconciencia y mitigar el peligro cuando se administra anestesia profunda producida por barbitúricos, así como para presentar la insensibilidad al dolor (Hill y Kolb, 1999).

Los alcaloides extraídos de semillas de *Erythrina* tienen propiedades curativas, pero los isómeros α y β de eritroidina así como su dihidroderivado (dihidro- β -eritroidina) presentan la mayor potencia en los ensayos clínicos. Al convertir β -eritroidina en la metasal cuaternaria (metilyoduro de β -eritroidina) la actividad curariforme es casi nula; esto representa una excepción de que la conversión de muchos alcaloides en metasales cuaternarias presentan acción curarizante (Kats, 1971). Las eritroidinas

tienen un efecto antagonista de la acción nicotínica de la acetilcolina en la unión sináptica ganglionar. β -eritroidina y su dihidroderivado producen un tipo de bloqueo neuromuscular no despolarizante, similar al de la tubocurarina y probablemente posean un mecanismo de acción idéntico.

Las eritroidinas se absorben por vía oral, atraviesan la barrera hematoencefálica y penetran fácilmente en la médula espinal, ejerciendo un efecto depresor en el encéfalo y la médula espinal. Bloquean la respuesta de las interneuronas de Renshaw a la acetilcolina liberada por los axones colaterales de las motoneuronas (Bowman y Rand, 1984). La muerte se produce por parálisis motora y por asfixia a consecuencia de la parálisis del diafragma (Kolb y Getz, 1976).

La absorción gastrointestinal de eritroidina y su dihidroderivado, es tan rápida y completa, hay pocas diferencias entre las dosis orales eficaces y las subcutáneas. Dihidro- β -eritroidina tiene una acción más prolongada y es seis veces más activa que la β -eritroidina, ambos alcaloides se contrarrestan en la conexión neuromuscular mediante la acción de las anticolinerasas tales como la prostigmina y a diferencia del curare producen una depresión del sistema nervioso central en dosis clínicas (Haberer, 2017).

El Dr. Altamirano sugirió su uso en lugar del curare para emplearse en experiencias fisiológicas y para el tratamiento del mal de Corea (Lozoya y Lozoya, 1982). Los extractos acuosos de semillas de *Erythrina* administrados tiene una acción típica a la del curare administrado en aves, anfibios y mamíferos; no es tan potente en su duración como el curare, pero la parálisis puede ser controlada más fácilmente. Estos extractos son efectivos por medio de inyecciones intravenosas, intramusculares o hipodérmicas, pero no por administración gástrica, se han determinado las dosis paralizantes del nervio aórtico y las dosis tóxicas para diferentes animales, la parálisis respiratoria es de origen periférico (Lehman, 1937). Las plantas del *Erythrina* tiene un poder completamente curárico y su acción es acompañada por un aumento en la reobase y cronoxia de los nervios y músculos. La curarización por dosis mínimas es reversible y desaparece después de pocas horas. En los perros el extracto produce muerte por parálisis del nervio frénico; si se provoca la respiración artificial y se

continúa por bastante tiempo es posible que el animal se recupere. En sapos y en mamíferos el extracto paraliza el vago. La inyección intravenosa produce una hipotensión cataléptica (Barrera, 1958).

2.16 Estudios previos realizados con los alcaloides de *Erythrina* en el SNC

Los estudios farmacológicos en los alcaloides de *Erythrina* han comenzado desde la década de los 80's, entre los estudios más relevantes con ellos destacan los de Williams y Robinson (1984), quienes trabajaron con el antagonista nicotínico colinérgico dihidro- β -eritroidina sobre el tejido cerebral de la rata. Los resultados mostraron que dihidro- β -eritroidina está ligado al reconocimiento del sitio nicotínico en el cerebro de la rata el cual es neuromuscular, más que del tipo gangliónico.

En 1995, se evaluaron los efectos farmacológicos *in vivo* de dihidro- β -eritroidina, un antagonista nicotínico, en ratones; concluyeron que este alcaloide, un antagonista neuromuscular nicotínico, es capaz de bloquear algunas acciones centrales de la nicotina después de una administración sistémica. Este mecanismo es diferente al de la mecamilamina y puede verse involucrado una acción directa de dihidro- β -eritroidina sobre un receptor nicotínico (Damaj *et al.* 1995).

Por otro lado se evaluó el efecto de las inyecciones intraventriculares del dihidro- β -eritroidina sobre la memoria espacial de la rata, encontrando que existe una disociación entre los efectos de la nicotina y la actividad locomotriz, y que dihidro- β -eritroidina fue capaz de atenuar significativamente el aumento de la actividad motora horizontal, pero no afectar la reducción inicial de la actividad vertical en un laberinto de agua Morris (Curzon *et al.*, 1996). Los autores mencionan que el proceso nicotínico de memoria parece estar involucrado en pruebas de memoria espacial debido al bloqueo de los receptores nicotínicos que presenta con la administración de dihidro- β -eritroidina.

Se realizó una investigación donde se examinó la influencia del antagonista de la nicotina, dihidro- β -eritroidina (DH β E), sobre varios efectos conductuales de la nicotina en ratas (Stolerman *et al.*, 1997). Encontrando que la DH β E bloqueó de forma potente los efectos del estímulo locomotor activador y discriminativo de la nicotina en dosis que no antagonizaron sus efectos depresores locomotores y de reducción de la velocidad

de respuesta operante, mencionando que este bloqueo selectivo apoya la participación de diferentes subtipos de receptor nicotínico en la mediación de diversos efectos conductuales.

En otro estudio se examinó la capacidad del hidrobromuro de dihidro- β -eritroidina como antagonista competitivo del receptor nicotínico de alta afinidad (DH β E) para antagonizar el efecto ansiolítico de la nicotina después de la infusión intra-Núcleo del Rafe Dorsal (NRD) utilizando la prueba de interacción social (Cheeta *et al.* 2001). El aumento en la interacción social observado después de la administración de nicotina (5 ng) en el DRN se revirtió completamente mediante la coadministración de 100 ng de DH β E. Por otro lado 100 ng de DH β E, cuando se administró en el DRN, no modificó el tiempo dedicado a la interacción social, sin embargo, aumentó significativamente la actividad locomotora y este efecto no fue antagonizado por la coadministración de 5 ng de nicotina en el DRN. Debido al perfil farmacológico de DH β E, resultados de esa investigación muestran que el efecto ansiolítico de la nicotina en el DRN está mediado por el subtipo de receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$.

En cuanto a los estudios previos realizados con el alcaloide erisodina se menciona el realizado por Decker y colaboradores en 1995, en el cual evaluaron erisodina administrada sistémicamente en el cerebro de ratones, atenuando significativamente los efectos hipotérmicos de la nicotina y su efecto ansiolítico en la prueba de laberinto en cruz elevado. Hubo una mayor separación entre las dosis de antagonistas y tóxicas para la erisodina que para la dihidro- β -eritroidina, quizás debido a la mayor selectividad de la erisodina por los receptores neuronales $\alpha 4\beta 2$. En ratas, erisodina previno tanto la disminución del desarrollo temprano como el aumento del desarrollo tardío de la actividad locomotora producida por la nicotina. La naturaleza potente y competitiva del antagonismo de erisodina, junto con su capacidad para ingresar al cerebro después de la administración sistémica, sugiere que erisodina puede ser una herramienta útil para caracterizar los receptores de acetilcolina nicotínicos neuronales.

En otra investigación se compararon los efectos del antagonista competitivo erisodina y el antagonista no competitivo mecamilamina en ratas entrenadas para discriminar o autoadministrar nicotina (Mansbach *et al.*, 2000). Encontrando que erisodina (0,3 a 10

mg/kg) y mecamilamina (0,1 a 1,0 mg/kg) bloquearon la discriminación de la nicotina . Así, basándose en la afinidad conocida de erisodina por los receptores neuronales de acetilcolina $\alpha 4\beta 2$ y su selectividad con respecto a los receptores $\alpha 7$ y $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$, los datos encontrados concluyen que existe un papel crítico de las construcciones de los receptores neuronales de acetilcolina que contienen $\beta 2$ en las acciones discriminatorias y reforzadoras de la nicotina.

López-Varela, (2007), se enfocó en determinar la participación de los receptores $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo dorsal del cerebro de rata sobre la consolidación de una prueba de evitación inhibitoria utilizando ratas macho Wistar, a los cuales se les administró 1, ó 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de erisodina para interferir con la consolidación de la memoria, así como, grupos adicionales recibieron 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de nicotina ó 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dihidro- β -eritroidina; al grupo control se le administró 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ de solución salina 0.9%. La ausencia de diferencias en la adquisición y el escape sugiere que, en las ratas se presentó una actividad similar en la primera exposición a la cámara y al exponerse al choque eléctrico se generó la misma reacción. Los resultados en este estudio aportan evidencia sobre la participación del sistema colinérgico neuronal del hipocampo dorsal en la consolidación de la memoria.

En otro estudio se utilizaron ratas macho Wistar a las cuales les fueron colocadas cánulas insertadas bilateralmente en el hipocampo dorsal, la cual es la región del cerebro que tiene relación con las tareas de memoria (Garín-Aguilar *et al.*, 2009). Encontraron que después de 8 días de ser sometidos a la cirugía, las ratas se entrenaron en una tarea de evitación inhibitoria, y posteriormente se les administro uno de los siguientes tratamientos: 1 ó 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de erisodina; 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de dihidro- β -eritroidina (DH β E) ó 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de nicotina. Se estableció un grupo denominado control al cual se le administro 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ de solución salina. Veinticuatro horas a la sesión de entrenamiento se evaluó la retención de memoria, hallando que la dosis con nicotina no afectó la retención de la tarea, sin embargo existió un deterioro significativo con los antagonistas erisodina y DH β E, lo cual demuestra que existe participación del receptor $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo dorsal en la consolidación de la memoria en una tarea aversiva. Sugieren que, gracias a las bajas retenciones observadas con la dosis de DH β E,

existen otros receptores como $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 7$ con afinidad a DH β E que probablemente ocasionan un deterioro adicional sobre la consolidación de la memoria.

En 2010 García-Martínez, estudió el bloqueo de receptores $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ en el hipocampo ventral de ratas macho Wistar en el aprendizaje de evitación, los animales recibieron microinyecciones de nicotina DH β E, erisodina y solución salina; las ratas fueron entrenadas en la caja de evitación, recibiendo un choque eléctrico. Los resultados mostraron que los alcaloides DH β E y erisodina interfirieron en el aprendizaje de evitación, dañando la memoria de corto y largo plazo. De tal forma que los resultados encontrados sugieren que existe la participación de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ del hipocampo ventral en la modulación del aprendizaje de evitación y en lo que se refiere al papel que juega erisodina específicamente sobre los receptores $\alpha 4\beta 2$ en la memoria de largo plazo.

En otro estudio se extrajo erisodina de semillas de *Erythrina americana* y determinó la participación del receptor $\alpha 4\beta 2$ en la consolidación de la memoria en el hipocampo ventral de ratas Wistar macho, en una tarea de evitación inhibitoria. Los animales recibieron los siguientes tratamientos: nicotina, DH β E, erisodina o solución salina. Los resultados indicaron que el agonista colinérgico nicotina no deterioró la memoria, mientras que los antagonistas DH β E y erisodina evitaron la consolidación de la tarea de evitación, por ello, en este estudio se encontró que el daño de la memoria fue mayor con DH β E que con erisodina, esto sugiere la posibilidad de que los otros receptores a los que DH β E es afín ($\alpha 3\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 7$), ocasionan un deterioro adicional en la consolidación de la memoria (García-Mendoza, 2015).

2.17 El sistema límbico

“El sistema límbico es un grupo interconectado de las estructuras corticales y subcorticales dedicado a vincular los estados de la emoción visceral con la cognición y el comportamiento” (García-Mendoza, 2015). El término límbico fue designado por Thomas Willis (1664) para asignar la zona de la frontera cortical que rodea el tronco del encéfalo (limbo: 'frontera' en latín), actualmente este nombre se emplea, para señalar las regiones dedicadas a una amplia gama de funciones.

El sistema límbico tiene injerencia sobre el aprendizaje, la memoria y sobre las emociones, de forma particular en el sistema autónomo y neuroendocrino. Así mismo, este sistema se encuentra implicado en trastornos neuropsiquiátricos como la fisiopatología de la epilepsia del lóbulo temporal (Sitoh y Tien 1997).

Este sistema consta de estructuras que se encuentran interrelacionadas entre sí tales como la circunvolución cingular (que es la estructura que rodea al cuerpo caloso y está limitada por el surco caloso marginal), la cisura longitudinal (la cual separa el hemisferio derecho e izquierdo del cerebro), el septum (que se ubica en la pared medial del cuerno anterior y cuerpo del ventrículo lateral), el cuerpo mamilar del hipotálamo (localizado en cada lado), el fórnix (cuya cara inferior del cuerpo caloso se localiza con el cuerpo del fórnix), el hipotálamo (que se encuentra por debajo del surco del hipotálamo en la pared lateral del tercer ventrículo), la amígdala (localizada adelante y arriba de la punta del asta inferior del ventrículo lateral) y el hipocampo (éste se encuentra dentro del lóbulo temporal) como se muestra en la Figura 10.

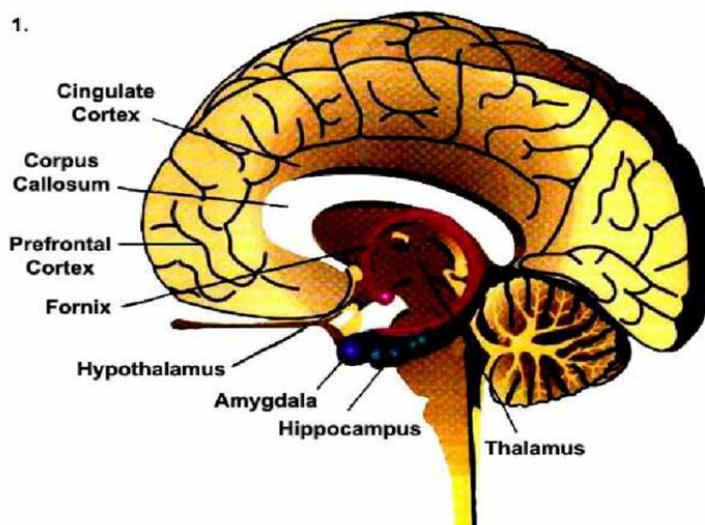


Figura 10. Componentes estructurales y funcionales del sistema límbico (tomado de: general.rau.ac.za).

2.18 Hipocampo

Ashby y colaboradores en 2010, mencionan que en la memoria implícita intervienen diversas estructuras del cerebro que se ve involucradas con el aprendizaje procedimental, ejemplo de ello son los ganglios basales que intervienen en el aprendizaje de hábitos y habilidades, así también estructuras como el cerebelo tiene injerencia en los condicionamientos de respuestas motoras y los condicionamientos emocionales están relacionados con la amígdala (Timmann, 2010). La memoria declarativa es la memoria espacial donde se ven involucrados diversos mecanismos específicos para codificar, almacenar y recuperar información acerca de localizaciones de espacio (Buzsáki y Moser, 2013). Por otro lado, el hipocampo es una estructura del cerebro que se relaciona a la memoria declarativa (Morris, 2006).

El hipocampo toma su nombre por la similitud que tiene al caballito de mar, ya su estructura tiene el tubo curvado. Estructuralmente está formado por el cuerno de Amón (CA), que es el cuerpo del hipocampo el cual se divide en la regiones CA1, CA2 y CA3, también está constituido por el complejo subicular constituido por el presubiculum, subiculum y parasubiculum, el giro dentado y la corteza entorrinal (Figura 11) (Amaral y Witter, 1989).

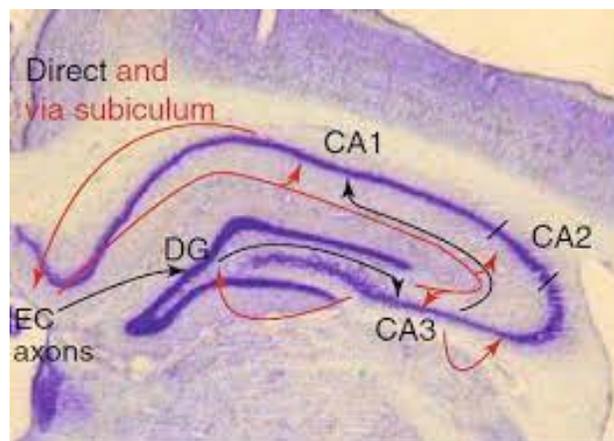


Figura 11 Áreas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo (Tomado de https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/82472/1/TG01749.pdf).

El hipocampo se diferencia funcionalmente a lo largo de su eje dorsoventral (septotemporal), ya que las conexiones corticales y subcorticales del hipocampo dorsal y ventral son diferentes, con información derivada de las cortezas sensoriales que ingresan principalmente en los dos tercios o tres cuartos dorsales de la circunvolución dentada (Moser y Moser, 1998). Anatómicamente de acuerdo a los estudios realizados se dice que las conexiones de entrada y de salida del hipocampo dorsal y ventral son diferentes (Swanson y Cowan, 1977). Por otro lado, Moser y su grupo de investigación evidenciaron que el aprendizaje y la memoria son procesos que se encuentran asociados a la navegación, exploración y locomoción son dependientes del hipocampo dorsal, y Henke (1990) demostró el hipocampo ventral está relacionado con las respuestas al estrés, comportamiento motivacional y emocional.

La organización del hipocampo es de tipo laminar y en el microscopio fácilmente se distinguen las capas. Así en la parte dorsal, se localiza la capa más superficial que es el *stratum oriens* (**so**), en ella se albergan los cuerpos celulares de las interneuronas. La siguiente capa es la celular piramidal (**pyr**), en ésta se ubican los somas de las neuronas piramidales. En el resto de las capas se encuentran las proyecciones de estas neuronas, en el *stratum radiatum* (**rad**) se localizan las proyecciones colaterales de Shaffer, que son la proyección de CA3 a CA1 (Andersen, 2007) (Figura 12).

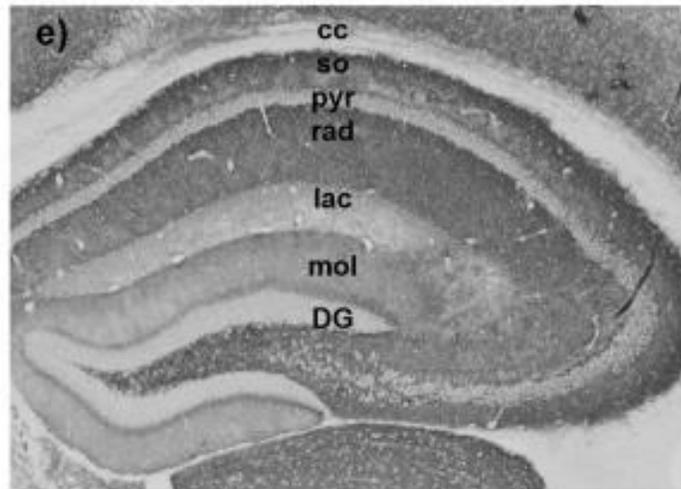


Figura 12. Capas del hipocampo. DG: Giro dentado; mol, capa molecular; lac: *stratum lacunosum*; rad: *stratum radiatum*; pyr: capa celular piramidal; so: *stratum oriens* (tomada de Hilton *et al.*, 2013)

2.19. Concepto de transmisión química

Existen sustancias químicas que intervienen en la transmisión de información entre las células, éstas se encargan de controlar la conducta de las células o de los órganos. De tal forma que para que se lleven a cabo éstas transmisiones es necesaria la presencia de células que liberen sustancias químicas y además de la intervención de moléculas proteicas especializadas que las detecten y que son los denominados receptores. La diferencia de ellas radica principalmente por la distancia entre la célula que secreta la sustancia química y los receptores que detectan su presencia.

Estas sustancias químicas, llamados neurotransmisores, se liberan a través de los botones terminales y son detectadas por los receptores que se encuentran en la membrana de otra célula que se ubica a muy poca distancia. Los neuromoduladores viajan más lejos y por tanto se dispersan más, estos también son liberados desde los botones terminales, pero son secretados en mayores cantidades y viajan a una mayor distancia, y como consecuencia de ello en una zona determinada del cerebro pueden modular la actividad de muchas neuronas. Gran parte de los neuromoduladores están formados por péptidos que son moléculas de tipo proteico, los péptidos tienen efectos sobre las células al unirse al lugar de unión (binding site) que es una región específica de la molécula receptora. La forma del lugar de unión y la de la molécula de la

sustancia transmisora son complementarias, la molécula de transmisor encaja en el lugar de unión de forma similar a como lo hace una llave con la cerradura (Guyton, 2001).

2.20 Acetilcolina

La acetilcolina es la sustancia que se libera cuando ocurre la sinapsis de los músculos esqueléticos (uniones neuromusculares) de los vertebrados, es también la sustancia transmisora en los ganglios (que son acumulaciones terminaciones nerviosas y de cuerpos celulares localizados fuera del sistema nervioso central) del sistema nervioso autónomo. Este sistema es parte del nervioso periférico el cual se relaciona con las funciones vegetativas (control del aparato digestivo, frecuencia cardíaca, etc). Los axones de las neuronas preganglionares, cuyos cuerpos celulares están localizados dentro del sistema nervioso central, entran a los ganglios periféricos, donde hacen sinapsis con las neuronas postganglionares, cuyos axones pasan a los órganos efectores inervados por ellas. La acetilcolina se utiliza para transmitir de las neuronas preganglionares a neuronas postganglionares impulsos postsinápticos eléctricos. Estas neuronas postganglionares va afectar a los órganos efectores y como respuesta a ello secretan acetilcolina o noradrenalina (Carlson, 2004).

2.20.1 Síntesis de acetilcolina

La acetilcolina es sintetizada por la enzima colina-acetiltransferasa (CAT) llamada anteriormente como acetilasa de colina de la siguiente manera:



En presencia de la enzima CAT, el ion acetato de la molécula de acetil CoA es transferido a la molécula de colina, produciendo una molécula de ACh y una CoA simple (Figura 13). Durante una estimulación nerviosa, la acetilcolina recién sintetizada puede ser liberada en forma preferente. Sin tomar en cuenta la fuente, la acetil CoA se sintetiza principalmente en la mitocondrias.

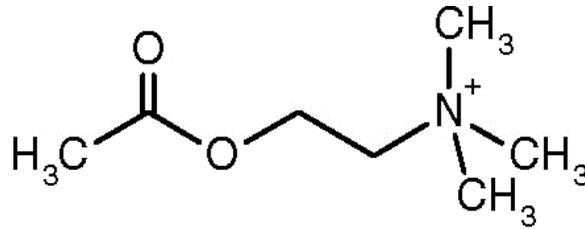


Figura 13. Estructura de la acetilcolina.

La enzima colina-acetiltransferasa es activada por cloruros y es inhibida por los grupos sulfhidrilo y puede emplear derivados acilo tanto de la coenzima A como de la etanolamina como sustrato. La colina se sintetiza en el hígado, la cual se deriva del desdoblamiento de los lípidos y se capta por transporte activo, pasando a la neurona, tomándola de la circulación general tanto en forma libre como en forma de fosfolípidos. Existen tres mecanismos para regular la concentración de ACh en las células: inhibición retroactiva de ACh sobre la colina-acetiltransferasa, la acción de masas y la disponibilidad de la acetil CoA, colina o ambas. De estas tres formas el factor de regulación más importante es el transporte de colina de alta afinidad. Además la concentración endógena de ACh también interviene en la regulación de la concentración del transmisor en el cerebro (Bowman y Rand, 1985; Carlson, 2004).

La producción de ACh guarda relación directa con la concentración de colina. La ACh se almacena en las vesículas sinápticas, de modo que al llegar el impulso nervioso, varios cientos de vesículas descargan simultáneamente el neurotransmisor hacia la hendidura sináptica. Los iones calcio son indispensables para este proceso y son antagonizados por los iones magnesio. En la fase de liberación no se vacían totalmente las vesículas y un 15% de la sustancia permanece en la célula terminal. La ACh que llega a la célula receptora se acopla a receptores específicos muscarínicos y nicotínicos. La activación del receptor muscarínico es rápida mientras que la del nicotínico es más lenta y sostenida.

2.21 Receptores colinérgicos

Existen dos tipos de receptores de ACh, uno de ellos es ionotrópico, que se encuentra asociado a canales iónicos y uno metabotrópico, en donde éste receptor está asociado

a las proteínas G. Ambos tipos de receptores se identificaron cuando los investigadores se dieron cuenta de que la activación de los mismos se daba por sustancias distintas. La sustancia responsable de la estimulación del receptor ionotrópico para ACh es la nicotina, el cual es un alcaloide presente en las hojas de tabaco, y para el caso del receptor metabotrópico para ACh la estimulación se lleva a cabo la muscarina, un alcaloide que se localiza en el hongo *Amanita muscaria*. Debido a lo anterior, los dos receptores para ACh fueron nombrados receptores muscarínicos y receptores nicotínicos (Carlson, 2004).

2.22 Receptores neuronales nicotínicos de acetilcolina

Los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) son canales iónicos de compuerta que se activan por ligando, los cuales están ampliamente distribuidos en el cerebro, se encargan de mediar la transmisión de señales a través de la unión neuromuscular, así como en la sinapsis a nivel central y periférico. Existen múltiples subtipos de estos receptores, cada uno con un perfil farmacológico y funcional. Estos median los efectos de la nicotina droga de amplio uso, están implicados en un número de procesos fisiológicos y conductuales y se ven involucrados en condiciones patológicas como la Esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y de Parkinson.

La localización de los receptores nicotínicos se da a nivel de la unión neuromuscular en prácticamente todas las membranas de las fibras musculares esqueléticas (Figura 14) (Guyton, 2001).

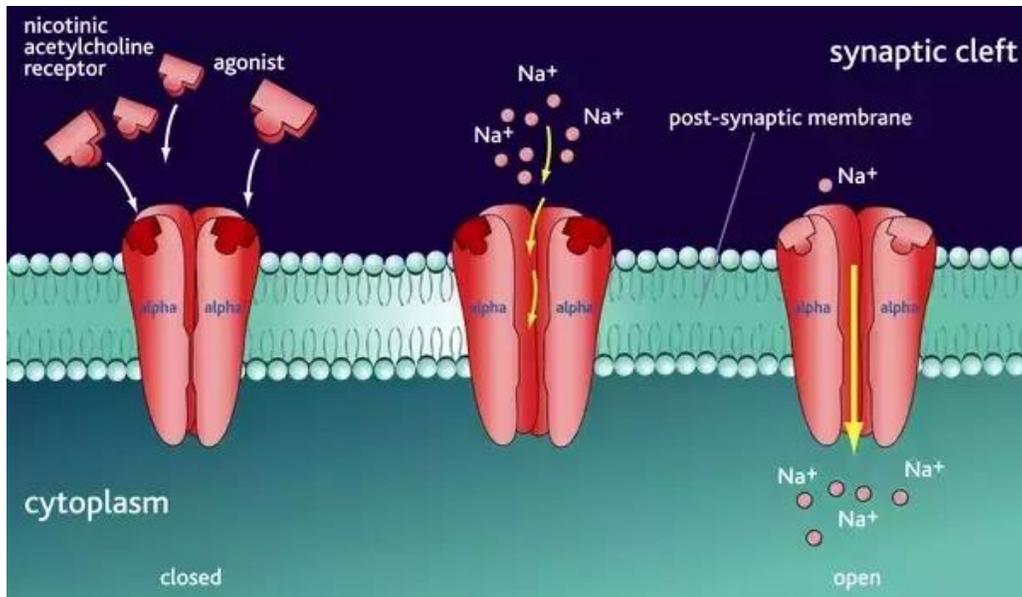


Figura 14 Receptores nicotínicos de la Acetilcolina (Tomado de <http://pharmacologycorner.com/acetylcholine-receptors-muscarinic-and-nicotinic/>).

Las investigaciones bioquímicas en los receptores neuronales de *Torpedo* han establecido que los tipos periféricos y neuronales están formados por proteínas que a su vez contienen cinco subunidades en un canal iónico, por el cual fluyen hacia el interior celular iones de calcio y sodio, mientras que salen iones potasio. Estos se incluyen en una familia de canales iónicos activados por ligandos conocidos como receptores ionotrópicos (Paterson y Nordberg, 2000). Las subunidades están formadas por $\cong 450-700$ aminoácidos.

Estructuralmente todos los miembros de la familia se caracterizan por presentar tres dominios bien diferenciados extracelular hidrofílico, transmembranal hidrofóbico e intracelular hidrofílico. En cada subunidad se forman 4 dominios transmembranales que atraviesan la membrana lipídica los cuales se denominan de M1 al M4. Para el caso del dominio M2 éste está formado por aminoácidos que forman la pared del poro, con un diámetro $\cong 7$ Å y constituye el filtro de selectividad pues se limita el flujo de las moléculas cuyos radios son $> \sim 7$ Å, este diámetro suficientemente ancho para permitir el paso de K^+ y Na^+ . Los aminoácidos que se localizan hacia la luz del poro se combinan para formar 6-8 anillos, de los cuales tres presentan una carga negativa (anillos aniónicos), localizados en la región extracelular (entrada del canal) denominado

anillo externo, otro conocido como intermedio, y finalmente otro denominado citoplasmático localizado en la parte del citoplasma del poro. La importancia de estos anillos es para determinar las propiedades de selectividad y la conductancia iónica de los receptores nicotínicos. El dominio intracelular está formado por un asa grande constituida por aminoácidos de M3 a M4 y un asa corta formada por un segmento entre M1-M2, el dominio extracelular contiene terminales carboxilo y amino de cada subunidad. En la terminal amino se encuentran los sitios de unión con el agonista (Paterson y Nordberg, 2000).

Las propiedades funcionales comunes observadas en esta familia pueden resumirse en que: los receptores tiene la capacidad de reconocer y de unirse a transmisores específicos, la unión del ligando abre el canal iónico para producir un flujo de iones y con la presencia prolongada del agonista, los receptores se desensibilizan y en tal caso el canal no podrá conducir iones (Arias, 1998).

El canal es un pentámero polipeptídico compuesto de diversas combinaciones de subunidades α , β , δ y ϵ . En el tipo muscular de receptor nicotínico, los sitios de unión a acetilcolina están formados por bolsas en la interfaz de las subunidades α y δ y las subunidades α y ϵ . La unión de acetilcolina al receptor causa entrada de sodio, despolarización de la membrana, liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y contracción muscular (Figura 15). Los receptores neuronales son diferentes ya que estos no presentan subunidades γ , δ , ϵ . Estos receptores consisten de varios complementos de subunidades de $\alpha 2$ - $\alpha 9$ y $\beta 2$ - $\beta 4$. Hasta la fecha seis subunidades α ($\alpha 2$ - $\alpha 7$) y tres β ($\beta 2$ - $\beta 4$) han sido identificadas y clonadas del cerebro humano. En contraste con los receptores musculares, estos receptores pueden reunirse de acuerdo con su estequiometría general $2\alpha 3\beta$, con la posibilidad de más subunidades α , conocido como pentámero, así mismo las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$ son conocidas de forma funcional como homo-oligómeros que constan de una subunidad de manera individual (Flores y Segura, 2005).

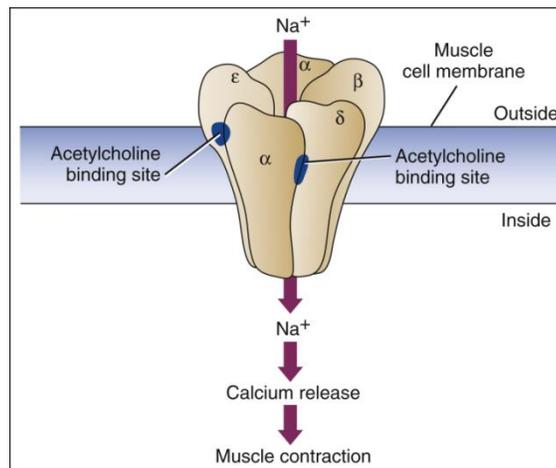


Figura 15. Subunidades de los receptores nicotínicos (Tomado de <https://basicmedicalkey.com/acetylcholine-receptor-agonists-2/>)

2.23 Sitios de ligandos

Una gran gama de químicos son conocidos por ser fármacos activos sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina. Estos fármacos que actúan sobre estos receptores pueden ser divididos en tres tipos:

1. Agonistas
2. Antagonistas
3. Ligandos alostéricos-activando e inhibiendo

2.23.1 Sitio ligando de ACh

Los sitios ligando interactúan de una manera cooperativa y así ambos sitios son ocupados por la acetilcolina o los agonistas nicotínicos involucrados en la activación del canal. Los dos sitios de ligandos de los receptores neuronales heterooligoméricos se ubican en la interfase, entre las subunidades α y β . Sin embargo, en los receptores homooligoméricos $\alpha 7$, $\alpha 8$ y $\alpha 9$, se han identificado cinco sitios de ligando idénticos debido a la naturaleza idéntica de las subunidades.

2.23.2 Sitios de ligandos Alostéricos

La función que presentan los receptores nicotínicos de Acetilcolina está ligada a la modulación por una variedad de compuestos incluyendo la fisostigmina, esteroides, etanol y bloqueadores de los canales de Ca^{2+} que no ligan a los sitios clásicos de ACh,

sino a un número de estructuras distintas a los sitios alostéricos los cuales son insensibles a ACh, así mismo se agrupa en el sitio alostérico activador no competitivo; localizado en la subunidad α del receptor.

Son denominados canales activadores ya que intensifican la apertura del canal y la conductancia de iones. En este grupo se incluyen los inhibidores de la colinesterasa, fisostigmina, tacrina y los relajantes musculares.

Sitio alostérico inhibidor no competitivo. Estos sitios inhiben la función del canal iónico, en este se incluyen a los anestésicos locales, barbitúricos y al etanol pueden activar este tipo de receptor, el cual produce como consecuencia, un efecto negativo en la función de los receptores nicotínicos, de tal forma que se afecta directamente al ligando de ACh. Se localizan en el canal iónico y está conformado por aminoácidos del segmento M2 en cada una de las cinco subunidades que forman al receptor con alta afinidad, mientras que el segundo se localiza en la interfase entre el receptor proteico y la membrana lipídica, aproximadamente de 10-20 en cada receptor, tienen baja afinidad ($>100 \mu\text{M}$), con ligandos que aceleran la desensibilización del canal iónico del receptor.

2.24 Distribución de los receptores nicotínicos de ACh en el cerebro.

Los receptores nicotínicos neuronales en comparación a los receptores muscarínicos, se expresan en el cerebro humano en baja intensidad. Además, su patrón de distribución es relativamente homogéneo y no se limita a las vías colinérgicas cerebrales bien definidas. La distribución neuroanatómica de varios subtipos de nAChR y las subunidades de ARNm han sido extensamente caracterizadas en el cerebro de roedores y pollos, pero no ha sido bien caracterizados en el cerebro de los seres humanos.

Las investigaciones realizadas hasta la fecha, han mapeado la distribución de sitios de AChR de alta afinidad utilizando nicotina, epibatidina y citisina con algunos estudios adicionales que mapean los sitios de unión de αBTX .

Algunos estudios mapearon la distribución de los receptores de ACh subunidad mRNA en el cerebro humano usando hibridación isotópica in situ (Cuadro 1). A pesar de la incompleta naturaleza de estos estudios realizados es posible dibujar un mapa de la distribución de los receptores de ACh en el cerebro, ya que estos receptores están presentes en una variedad de estructuras cerebrales, en particular en el tálamo, corteza y estriado (Paterson y Nordberg, 2000).

Cuadro 1. Distribución de los receptores de ACh en el cerebro humano (tomado de Paterson y Nordberg, 2000)

Región cerebral	$\beta 2$	$\beta 3$	$\beta 4$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	$\alpha 5$	$\alpha 7$
Corteza		+	+			+	
Prefrontal	+			++	+		++
Motora	+			++	+		+++
Entorrinal	+			++	+		+
Singular	+			+	+		
Temporal	+			+	+		
Tálamo		+	+			+	
Dorsomedial	+			+++			++
Lateroposterior			+++				
Reticular			++			+	
Ventroposterolateral	+			+++			
Cuerpos geniculados	+			+++		++	
Hipocampo	+			+			++
Giro dentado	+			+			++
Putamen caudado	+	+	+			+	++
Cerebelo	+	+	+	+	+	+	

La mayoría de los estudios que comparan la distribución de las subunidades, en muestras de sitio de ligandos de nicotina y α BTX coinciden en la teoría de que $\alpha 4\beta 2$, constituyen un subtipo predominante en el cerebro, por otro lado $\alpha 3$ predomina más en la corteza (neuronas piramidales), $\alpha 4$ es significativamente alta en la corteza temporal y cerebelo. La subunidad $\beta 2$ se encuentra presente en diversas estructuras como la corteza insular, lámina granular del giro dentado y en la región del hipocampo CA2-3, presente también en el estriado, la subunidad $\alpha 7$ predomina en el tálamo, no reticular, cuerpos geniculados lateral y medial, rama horizontal de la banda diagonal de Broca, se encontraron niveles moderados en el hipocampo, además pueden ser encontradas en la medula espinal, medula oblonga, puente, cerebelo y mesencéfalo. La subunidad $\alpha 5$ no es abundante en la corteza, $\alpha 3$ fue alta en el cerebelo, en comparación con $\alpha 5$ y $\beta 4$ que fueron significativamente bajos en la corteza y cerebelo (Paterson y Nordberg, 2000; Levin 2002).

2.25 Función de los receptores nicotínicos sobre el SNC

La nicotina es una amina terciaria compuesta de un anillo de piridina y uno de pirrolidina, es un potente modulador de la función del SNC, que mejora el flujo de iones y la liberación de neurotransmisores. La administración de nicotina diversos efectos fisiológicos tales como incremento de la presión sanguínea y la frecuencia cardiaca, además de incrementar la secreción de prolactina y ACTH (hormona adenocorticotrópica), de tal forma que se tendrá un aumento en la secreción de corticosterona. En cuanto a los efectos sobre el sistema nervioso, éstos son el incremento del flujo cerebral así como el incremento de la utilización de glucosa, además de incrementar la excitación, atención visual y percepción, disminuyendo el tiempo de reacción, tanto en fumadores como en no fumadores, la nicotina mejora con rapidez y precisión la función motora y la realización de tareas motoras complejas, como manejar un carro. Los receptores nicotínicos presinápticos se encuentran en las neuronas del en el hipocampo, las regiones corticales y el cerebelo, así mismo la nicotina interactúa con una gran variedad de receptores nicotínicos presinápticos que facilita la liberación de una gama de neurotransmisores incluyendo ACh, dopamina, noradrenalina, 5-hidroxitriptamina, GABA y glutamato, muchos de los cuales están

implicados en la modulación y la mediación de tareas conductuales (Araki *et al.*, 2002). La acción mejor conocida mediada por los receptores nicotínicos es la adicción de los fumadores a la nicotina, esta acción está motivada por factores de reforzamiento positivos y negativos. Los factores positivos son relajación, reducción del estrés, incremento en el periodo de vigilia, reforzamiento del conocimiento y reducción de peso corporal. Los factores negativos incluyen nerviosismo, inquietud, irritabilidad, ansiedad, disminución de la concentración y conocimiento, lo cual podría estar dado por la reducción en la estimulación de las neuronas dopaminérgicas del mesolímbico (Lindstrom, 1997). Por otro lado la medicación con nicotina podría beneficiar el tratamiento de las disfunciones cognitivas así como en la enfermedad del Alzheimer, esquizofrenia y déficit de atención y desorden de hiperactividad (Levin, 2002).

2.26 Aprendizaje

De acuerdo a diversos autores como Toro (2008) expresan que “La plasticidad neuronal es capacidad del sistema nervioso de cambiar, la cual está implicada en el desarrollo embriológico”. Sin embargo, en la etapa adulta, el aprendizaje, las nuevas habilidades, las nuevas memorias y la respuesta a las adversidades del medio, es debido a la plasticidad (Purves *et al.*, 2004). De tal forma que, el aprendizaje un desarrollo mediante el cual los seres cambian su conducta de manera que pueden acoplarse al cambio de condiciones cambiantes que se presenten en el medio en el que interactúan. Es la principal adaptación de los seres vivos (Morgado, 2005; Correa, 2007). Por ello es que el aprendizaje es un cambio que se da en el sistema nervioso gracias al resultado de la experiencia y que propicia los cambios permanentes de la conducta en los organismos.

En el aprendizaje se adquieren conocimientos de lo que nos rodea, y la memoria es el proceso en el cual la información adquirida en el conocimiento es codificado, almacenado, consolidado, y después recuperado, es por ello que la memoria y el aprendizaje y la memoria son fases que están íntimamente relacionadas. De tal forma que, no se separa el aprendizaje de la memoria, y no es posible realizar diferencias dentro del circuito neuronal (Machado *et al.*, 2008; Poolton *et al.*, 2005).

2.27 Memoria

Para que un sujeto aprenda, se requiere que las experiencias del pasado se almacenen de alguna forma, de manera que, cuando se encuentren otra vez los mismos estímulos, la reacción de éstos está determinada por lo que sucedió antes, a esta capacidad de recordar se le ha llamado memoria (Squire, 1987).

La memoria es un proceso intelectual complicado y es por ello que el sistema neuronal y anatómico debe ser complejo. En estudios desarrollados en los últimos años con animales se ha encontrado una mayor comprensión en el control del cerebro en el funcionamiento mnésico y el aprendizaje debido a las investigaciones en las lesiones cerebrales y alteraciones mnésicas con alteraciones de la memoria. En cuanto a su fisiología, cuando existen variaciones de la sensibilidad de transmisión sináptica de una neurona a la siguiente es cuando los recuerdos se producen. Gracias a estas variaciones se producen nuevas vías de transmisión de señales en los circuitos neurales del cerebro. Las vías nuevas o facilitadas son conocidas como huellas de la memoria, y su importancia radica en que una vez establecidas, la mente las activa y así reproducir los recuerdos (Guyton, 2001). Algunos autores refieren el aprendizaje y memoria como términos indistintos pero otros señalan diferencias entre ambos. Los estudios que se han realizado en el aprendizaje se enfocan en la adquisición de conocimiento y el desarrollo de nuevas conductas, así como los de la memoria en donde hacen referencia al papel que juega la retención o el recuerdo de las conductas y diversas situaciones; en el caso de la memoria hacen referencias a como persiste el aprendizaje en un estado que puede ser mostrado en un corto tiempo después (Squire, 1987).

La relación de lo que se ha aprendido tiene completa relación con la memoria, de tal manera que es ésta última la que posee la capacidad de recuperar las informaciones que se han ido adquiriendo con el paso del tiempo (Hummel *et al.*, 2002). Es por ello que, existen variación en la cantidad de neuronas durante toda vida y es posible explicar la gran cantidad de información que es almacenada en forma de memoria, es decir la sinapsis es el sustrato de proceso mnemónico (López-Rojas *et al.*, 2007; Fasce, 2008). Es así que, en la sinapsis se establece el sitio físico que sirve de enlace

en el paso de la información de una neurona a otra, y se lleve a cabo la interacción funcional de las diferentes partes del sistema (Kandel y Siegelbaum, 2000).

Por ello, para que el conocimiento se manifieste, se tiene que hacer referencia tanto a la memoria como a los mecanismos que permiten que la información se recupere, la memoria es por tanto la prueba de haber aprendido (Sperling, 1964). En la memoria se tienen diversas etapas, el primero es el *registro* o codificación, en donde se lleva la entrada de información, que es recibida por el sistema nervioso central, el segundo es la *consolidación* o almacenamiento de la información y por último la *evocación* de la información (Baddeley y Hitch, 1994).

2.28 Tipos de memoria

La memoria es caracterizada en dos categorías funcionales, desde el punto de vista neurobiológico: la memoria de corto plazo y la de largo plazo. La primera es una memoria lábil, de poca capacidad y duración reducida, mientras que la segunda es relativamente permanente, de gran capacidad y resistente a la interferencia. Aunque no se conoce a ciencia cierta cómo se forman estas memorias, se manejan varias hipótesis al respecto. Una hipótesis antigua, pero que hasta nuestros días ha sido vigente, en lo que respecta al establecimiento de la memoria de corto plazo asegura que esta de memoria depende de la actividad reverbante en circuitos neuronales, inducida por la experiencia del aprendizaje. El hecho de que la actividad sea fácilmente abatible encaja muy bien con las observaciones de que la memoria de corto plazo es lábil. En esta memoria se guardan datos que son útiles durante periodos temporales cortos (Prado *et al.*, 2004).

La memoria de largo plazo, por otro lado implica la producción de cambios plásticos relativamente duraderos: incremento en la densidad de botones sinápticos, en la longitud y ramificaciones axónicas, así como el número de espinas dendríticas, entre otros. Para que estas modificaciones morfológicas se lleven a cabo, es menester que se incremente la síntesis de proteínas: por el contrario la inhibición de la síntesis proteica impide la formación de la memoria a largo plazo.

La memoria de largo plazo depende de que la información adquirida haya ocupado

primero el pequeño almacén de corto plazo. La conversión de la memoria de corto a la de largo plazo depende de un proceso hipotético denominado consolidación: parece ser que esta conversión está supeditada a cuando menos dos factores dependientes de la experiencia: la importancia relativa que la información tiene para el organismo y la frecuencia con la que la información es captada por el sistema nervioso. Es bien sabido que aquellas experiencias con alto contenido emocional producen memorias muy estables, de igual manera se guarda en la memoria información que no es importante, pero a la que estamos expuestos repetidamente.

Es por ello, que el establecimiento de la memoria de largo plazo es dependiente de la interacción de diversos sistemas de neurotransmisores, los cuales se llevan a cabo en las diversas estructuras cerebrales. De tal manera que, es la acetilcolina (ACh) y la serotonina (5-HT) las sustancias más estudiadas y de los que se sabe que participan en la consolidación de la memoria (Prado *et al.*, 2004).

2.29 Papel que desempeñan los receptores nicotínicos en las funciones de memoria y cognición

La nicotina y los agonistas nicotínicos mejoran la memoria y la cognición en animales y humanos, mientras que los antagonistas como mecamilamina y dihidro- β -eritroidina deterioran la función de memoria (Levin, 1996). En roedores y primates, el tratamiento largo y corto plazo con agonistas mejora la realización de tareas de memoria, por otro lado, ha sido demostrado que el tratamiento con nicotina a corto plazo, mejora el proceso de memoria en gran número de estudios experimentales en ratas (Levin, 1996, Decker, 1995). Es así que, Levin (2002) hace referencia que los receptores nicotínicos tienen injerencia en la mayoría de las funciones en la conducta, incluida la función cognitiva, así los medicamentos nicotínicos pueden proporcionar un tratamiento beneficioso para la disfunción cognitiva, así, la nicotina mejora el rendimiento de la atención en las funciones conductuales y cuando se administra se mejora la memoria de trabajo en las ratas en una prueba en el laberinto radial, es por ello, que los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$ situados en el hipocampo ventral y la amígdala basolateral están implicados en la memoria de trabajo y los déficits de la memoria de trabajo inducidos por el bloqueo de $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral se revierten con el

tratamiento con nicotina sistémica crónica, mientras que la carencia de la memoria de trabajo los cuales son inducidos cuando hay un bloqueo de $\alpha 7$ del hipocampo ventral, no son revertidos cuando se tiene régimen de nicotina, así mismo, Levin (2002) hace referencia a que estos estudios de los mecanismos nicotínicos neuronales subyacentes a la función cognitiva son clave para abrir vías para el desarrollo de tratamientos nicotínicos seguros y eficaces para la disfunción cognitiva.

2.30 Ansiedad

De acuerdo con Rojas (2014), la ansiedad “es una vivencia de temor ante algo difuso, vago, inconcreto, indefinido, y a diferencia del miedo, tiene una referencia explícita”. Esta emoción se ve acompañada de reacciones adrenérgicas tales como: respiración agitada, tensión muscular, temblores, sudoraciones junto con dolores de cabeza, espalda, estómago, y/o pecho, también suelen presentarse palpitaciones, entre otros síntomas y que al aumentar estos niveles hace incapaz a un individuo de adaptarse a la vida cotidiana.

Algunos otros autores como Stossel (2014), hace referencia a la ansiedad como un proceso normal y automático que muchos organismos presentan en situaciones particulares de una forma compleja y determinante, que se produce como una respuesta a nivel mental de forma cognitiva o abstracta.

2.30.1 Ansiedad conductual

De acuerdo a Cedillo en 2017, la ansiedad tiene relación con diversos estímulos condicionados o incondicionados que hacen que ésta actúen de la misma manera en la respuesta emocional; produciendo un estímulo discriminativo, de tal forma que la ansiedad conductual se mantiene a partir de una relación funcional con un refuerzo que se generó en el pasado.

De esta forma, en el estímulo de ansiedad se tienen al menos 2 características, la primera es un estado emocional el cual es provocado por un estímulo perturbador, este estímulo anticipa al mismo ya que no precede ni acompaña al estado; la segunda característica hace referencia al estímulo que aún no ha pasado y que por lo tanto

pudiera actuar como una causa. Es por ello que, la respuesta que se da cuando se presenta un estímulo de estrés, se manifiesta como un elemento primordial de procesos adaptativos que son esenciales en la sobrevivencia del organismo (Hajós-Korcsok *et al.*, 2003), de tal forma que las adaptaciones que se presentan cuando hay estrés pueden causar trastornos afectivos como la ansiedad.

Algunos aspectos como expresiones faciales, patrones de comunicación e inquietud, son las principales respuestas al componente conductual (Gould *et al.*, 2002), y así estos aspectos se reflejan sobre el deterioro de las respuestas como ejecución de evitación y escape, sobretodo en el habla, tareas de vigilancia y motivación, debido a que existe una interacción de esta disposición emocional con los demás procesos psicológicos (vigilia, la atención, la percepción, el razonamiento y la memoria), dando como resultado que existan altos niveles de ansiedad que podrían dificultar la atención y concentración (Fernández-Castillo y Gutiérrez, 2009).

2.30.2 La ansiedad en neurobiología

Gómez (2007) menciona que en neurobiología se plantea la existencia de una anatomía de las emociones, el cual indica que existen ciertas regiones cerebrales que juegan un papel importante en experimentación. Además de ello menciona que, cuando existen procesos emocionales y cognitivo y emocional, hay conexiones a en todas la regio0nes cerebrales, es así que sistema límbico es el lugar donde se ubican las emociones, la cual es una región cerebral que involucra algunas estructuras internas del cerebro tales como el cíngulo, la amígdala, el hipotálamo, el hipocampo, y otras más, en estas estructuras hay conexiones hacia el tallo cerebral–médula, del cual emerge el nervio Vago, que va inervar todos los órganos del tórax y del abdomen, incluyendo el corazón y el intestino.

2.31 El papel de los receptores nicotínicos en la ansiedad

Los individuos que padecen un trastorno de ansiedad presentan síntomas como gran preocupación y ansiedad, aunados a la dificultad para controlarlas. Estos síntomas se asocian a otros más sobretodo experimentan inquietud y agitación, frecuentemente existe fatiga, así como dificultad para concentrarse, se vuelven irritables con gran

tensión muscular y en la mayoría de los casos hay una alteración del sueño (Gelder *et al.*, 1996).

Hughes en 1986, menciona que estudios epidemiológicos demuestran que, el 49% de los pacientes que presentan ansiedad y depresión son fumadores esto con respecto al resto de la población y gracias a ello se sugiere que la nicotina podría tener efectos benéficos en estos pacientes.

Diversos autores (Pomerleau, 1986; Decker *et al.*, 1993) han demostrado que la nicotina y algunos de sus agonistas (ABT-418) producen efectos parecidos a los de los ansiolíticos y los antidepresivos en los modelos animales. Así mismo, cuando se colocan parches nicotínicos en pacientes que no fuman éstos presentan efectos antidepresivos (Salin-Pascual *et al.*, 1996).

Es así que, la ansiedad y la depresión están íntimamente relacionados con el sistema colinérgico septo-hipocampal (Gray, 1988); de tal forma que es la nicotina la sustancia que tiene efecto sobre el hipocampo y como resultado de ello se producen efectos de tipo ansiogénicos (Ouagazzal, 1999).

2.32 Modelos conductuales

Para poder evaluar el efecto de los fármacos ansiolíticos se utilizan diversos modelos de animales, así también estos modelos permiten estudiar los mecanismos de comportamiento que presentan los organismos como respuesta a un estímulo.

Los modelos animales de ansiedad necesariamente implican la interferencia con procesos psicobiológicos, como la capacidad motora, la motivación (en la privación de alimentos y/o agua), la percepción (frecuentemente de estímulos dolorosos), el aprendizaje y la memoria (Handley y McBlane 1993). La interferencia de la privación y el dolor se pueden eliminar utilizando situaciones aversivas con base etológica, tal como los modelos de laberintos elevados (Pellow *et al.*, 1985).

2.33 Modelo de laberinto T elevado

El laberinto T elevado, es una prueba conductual derivada de una modificación del laberinto + elevado (Pellow *et al.*, 1985), éste último modelo, probablemente genere diferentes tipos de miedo/ansiedad, dando como resultado una variabilidad compleja de efectos de los fármacos (Handley y McBlane, 1993); por ello, este aparato fue modificado bloqueando la entrada a uno de sus brazos cerrados, dando origen al laberinto T elevado, siendo un excelente modelo para separar el miedo aprendido del no aprendido.

El laberinto T elevado es un modelo que permite evaluar los efectos de los fármacos en la ansiedad y la memoria en el mismo procedimiento. Cuando la rata es colocada en el extremo del brazo cerrado, los brazos abiertos no se alcanzan a ver hasta que el animal asoma la cabeza más allá de las paredes del brazo cerrado. Cuando se coloca al animal en uno de los brazos abiertos, parece ser una experiencia desagradable, ya que las ratas presentan un miedo innato a los espacios abiertos y elevados. Esto hace que el animal aprenda a evitar los brazos abiertos al ser colocado en repetidas ocasiones en el interior del brazo cerrado; y cuando la rata se coloque al final de uno de los brazos abiertos, posiblemente se moverá hacia el brazo cerrado, lo que se le llama respuesta de escape. Por un lado, la evitación inhibitoria de los brazos abiertos representa el miedo aprendido o condicionado, y por otro la respuesta de escape desde uno de los brazos abiertos representa el miedo innato o incondicionado; estos miedos han sido relacionados clínicamente con ansiedad generalizada y trastornos de pánico, respectivamente (Zangrossi y Graeff, 1997). Para la evaluación de la memoria, las conductas de evitación inhibitoria y el escape de una vía son evaluados 24 horas posteriores de la primera exposición al laberinto T elevado (Figura 16).

La ventaja de este modelo es que a los sujetos experimentales no les es restringido ni el alimento ni el agua, tampoco precisa estímulos aversivos como en el caso de la prevención pasiva o evitación inhibitoria (Viana *et al.*, 1994).

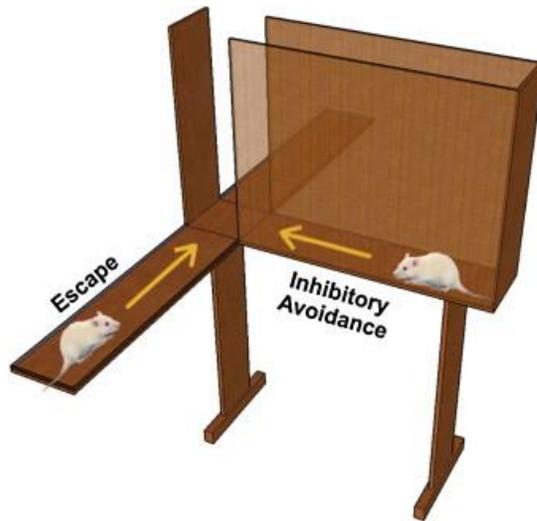


Figura 16. Laberinto T elevado (Tomado de [sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0149763414000608](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0149763414000608))

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Se recolectó del material vegetal de *E. americana* en la localidad de Colorines, Estado de México, *E. coralloides* en Texcoco, Estado de México, y las semillas de *E. herbacea* fueron proporcionadas por la Dra. María Eugenia Garín Aguilar de la FES Iztacala. El material seco se almacenó en bolsas de plástico y se trituró en un molino hasta obtener un tamaño de partícula muy fino.

4.2 Determinación taxonómica

La autenticidad de las especies recolectadas fue autenticada por el curador del herbario CHAPA del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo, Estado de México.

4.3 Extracción de alcaloides

La extracción preliminar de alcaloides se hizo de acuerdo con el método descrito por Games *et al.*, (1974). El material vegetal pulverizado se desgrasó con hexano durante 48 horas utilizando un aparato Soxhlet. Posterior a ello el extracto hexánico se concentró en un rotavapor a presión reducida, el residuo se lavó con H₂SO₄ a 2%, se filtró y extrajo con diclorometano (3x100), y se ajustó a un pH de 8 utilizando NaHCO₃. Por último, se hicieron extracciones con diclorometano (3x100), el disolvente se evaporó y se obtuvo la *fracción de alcaloides libres solubles en hexano*.

Para obtener la *fracción de alcaloides libres solubles en metanol*, el material seco y ya sin grasa se extrajo con metanol durante 48 h.

La fase acuosa de la fracción metanólica se acidificó con HCl concentrado hasta obtener un pH cercano a 2 y posteriormente se hidrolizó, para así obtener la *fracción de alcaloides liberados o hidrolizados solubles en metanol*.

4.4 Separación de los alcaloides

Los extractos fueron sometidos a diversas técnicas para lograr separar los alcaloides presentes en cada uno de ellos (García-Mateos *et al.*, 2005; Ibarra-Estrada *et al.*, 2011; Sánchez-Herrera *et al.*, 2001).

La separación se hizo con cromatografía en capa fina (CCF); se utilizaron placas cromatográficas de gel de sílice, eluyendo con una mezcla de diclorometano:metanol en proporciones 9:1. Después de correr las placas éstas fueron reveladas con el reactivo de Dragendorff que colorea de un tono naranja a los alcaloides, y posteriormente se compararon con estándares de los alcaloides puros para confirmar su identidad.

Para separar a los alcaloides de los extractos se utilizó la cromatografía en columna (CC), utilizando como elución diclorometano:metanol en diferentes proporciones.

4.5 Identificación de erisodina

4.5.1. Resonancia magnética nuclear (RMN-¹H)

Para identificar la pureza de erisodina aislada, ésta se analizó en un espectrómetro Bruker-360 de 300 MHz, utilizando como disolvente CDCl₃ y como referencia interna Trimetil silano.

4.6 Evaluación farmacológica (Modelo Conductual)

4.6.1 Animales

Para la evaluación farmacológica se emplearon ratas macho de la cepa Wistar, las cuales contaban con pesos entre 250-300 g aproximadamente, las cuales se colocaron en cajas de acrílico en grupos de cinco. Se mantuvieron sin restricción de alimento y agua. Los animales fueron colocados en el bioterio, de la FES Iztacala de la UNAM, a una temperatura de 22 ± 1°C, con un fotoperíodo de luz/oscuridad de 12 horas.

4.6.2 Cirugía

Antes de la cirugía los animales recibieron vía i.p. 20 unidades de atropina, para evitar complicaciones respiratorias y se anestesiaron administrando una solución de pentobarbital sódico (45 mg/kg i.p.). Éstos fueron sometidos a cirugía estereotáxica, de

acuerdo con el Atlas de Paxinos y Watson (2005). Las ratas fueron sujetadas al equipo estereotáxico y se les implantó bilateralmente cánulas de acero inoxidable del número 23 de 10 mm de largo dirigidas a la región dorsal del hipocampo ($AP = -4.1$, $L \pm 2.5$, $V = 3.1$) (Figura 17). A las cánulas se les colocóacrílico dental para mantenerlas fijas al cráneo y se les colocó un estilete de la misma longitud dentro de las cánulas para evitar que se taparan. Posteriormente, las ratas fueron regresadas a su caja habitación hasta su recuperación total. Todos los procedimientos se establecieron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio, NOM-062-ZOO-1999.



Figura 17. Cirugía estereotáxica de rata

4.6.3 Manipulación de las ratas

Cuatro días después de la cirugía las ratas fueron gentilmente manipuladas por el experimentador durante 3 o 5 días previos al experimento para reducir el estrés. La manipulación consistió en sacar a los animales de las cajas, revisar los estiletes de las cánulas y sujetarlas simulando la administración de las sustancias. Al sexto día durante la manipulación, se introdujo en las cánulas un falso inyector con la finalidad de evitar el estrés durante la administración de los tratamientos.

4.7 Tratamientos y microinyección

Siete días después de la cirugía, se les administraron los tratamientos a evaluar: 30 minutos antes de la prueba conductual a las ratas les fueron administrados en el

hipocampo dorsal los siguientes tratamientos: 1 μ L de solución salina a 0.9% (SAL), 3.4 μ g/ μ L de nicotina (NI), 3.4 μ g/ μ L de erisodina (ED1) o 6.8 μ g/ μ L de erisodina (ED2) administrados por separado.

Se inyectaron los tratamientos con cánulas bilaterales utilizando inyectores de acero inoxidable calibre 30 de 10.5 mm conectados a una microjeringa Hamilton de 10 μ L acoplada a una bomba de infusión continua (WPI modelo sp200i). Las cánulas se dirigieron al hipocampo dorsal y la velocidad de infusión fue de 1 μ L/min. Una vez terminada la administración de la microinyección, los inyectores permanecieron en las cánulas un minuto adicional. Después de 30 minutos de haber recibido las microinyecciones las ratas fueron sometidas a la prueba conductual.

4.8. Aparato

Para evaluar el efecto que tienen los alcaloides sobre los individuos, éstos fueron a un laberinto elevado en forma de T, el cual está elaborado en acrílico y con 3 brazos del mismo tamaño (50 x 12 cm). Uno de los brazos (el perpendicular a los 2 brazos opuestos), cerrado por paredes que miden 40 cm de alto y los brazos abiertos rodeados con un borde de 1 cm de alto (Figura 18 muestra un laberinto semejante al utilizado en este experimento).

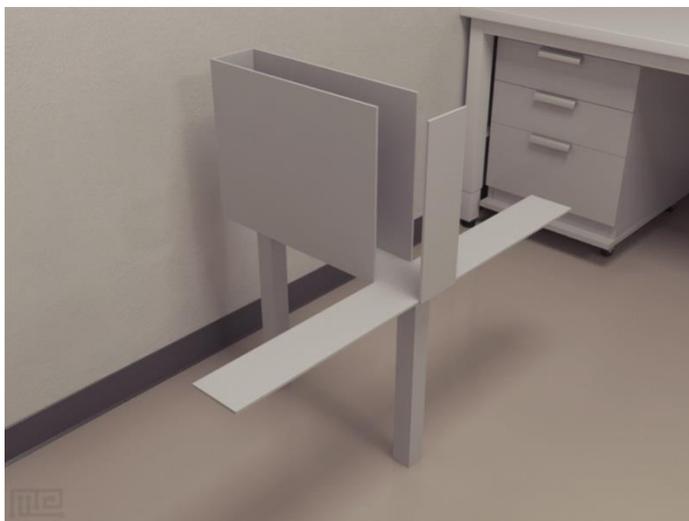


Figura 18. Laberinto en T. elevado (tomado de <https://www.medicalexpo.es/prod/mazeengineers/product-125279-908563.html>)

4.9 Procedimiento

Primero se entrenaron los sujetos experimentales. Para ello, 30 minutos después de haber administrado cada uno de los tratamientos, las ratas se colocaron individualmente dentro del laberinto elevado en T de modo que miraran hacia los brazos perpendiculares. A partir de ese momento se contabilizó el tiempo en que la rata cruzo con sus cuatro patas hacia alguno de los brazos abiertos (latencia de la línea base = LB). El animal fue retirado del laberinto y se colocó en su caja durante 30 segundos, posteriormente este procedimiento se repitió dos veces más registrándose ahora las latencias de evitación 1 (EV1) y evitación 2 (EV2), respectivamente.

Para la evaluación de las latencias de escape (ESC), la rata se colocó al final del brazo derecho abierto y se registró el tiempo que tardó en abandonar con sus cuatro patas el brazo abierto (Viana *et al.*, 1994).

Un día después del entrenamiento se llevó a cabo la fase de prueba en donde se registraron las latencias de evitación (evitación 3) y escape (escape 2) nuevamente, sin la administración de algún tratamiento. El experimento se realizó en silencio, con dos observadores dentro del laboratorio para registrar así los resultados.

4.10 Perfusión

Después de la prueba, cada uno de los sujetos fue sacrificado empleando una sobredosis de pentobarbital sódico y fueron perfundidos intracardialmente utilizando solución salina isotónica y posteriormente con formaldehído a 10%, para ello se utilizó una bomba de infusión (Modelo Manostat) con una velocidad de 48 RPM. Posteriormente, se extrajeron los cerebros los cuales fueron almacenados en frascos viales con una solución de formaldehído al 10%.

4.11 Histología y verificación de ubicación de las cánulas

Los cerebros fueron trasladados al Instituto de Neurobiología de la UNAM en el Campus Juriquilla y con el micrótomo criostato se hicieron cortes coronales de 50 micras, para posteriormente fijarlos en el portaobjetos. Éstos fueron teñidos con la técnica del Nissl, con la finalidad de verificar el sitio de ubicación de las puntas de las

cánulas en el microscopio, y así descartar aquellas donde las puntas no se localizaban en el área experimental.

4.12 Análisis estadístico

Para analizar las latencias de la prueba y entrenamiento se empleó la estadística no paramétrica. Todos los datos se presentan como media \pm error estándar de la media y se analizaron con una ANOVA de una vía, seguido de la prueba post hoc de Duncan. En todos los casos, un valor de $p \leq 0.05$ se consideró significativo. Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 22.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN GENERAL

5.1 Identificación y cuantificación de erisodina

Con el objeto de identificar y aislar erisodina de semillas de *Erythrina coralloides*, *E. americana* y *E. herbacea*, se prepararon los extractos de alcaloides libres y liberados. Los resultados se muestran en el Cuadro 2 y son expresados en gramos por kilogramo de tejido vegetal (peso seco). A partir de estos extractos se obtuvo erisodina cuya cantidad se expresa en gramos. Se observa que *E. herbacea* presentó la mayor cantidad de extracto libre y extracto liberado, además del valor más alto de erisodina aislada (0.24 g) en comparación con las otras especies *E. coralloides* y *E. americana* (0.12 y 0.19 g respectivamente)

Tanto erisodina como los demás alcaloides presentes en los extractos se separaron con cromatografía en columna utilizando como adsorbente sílice gel (400 g de gel de sílice G 60 Merck 70-230 mallas); la elución se hizo con diclorometano:metanol en proporciones 99:1 hasta 80:20 y se aislaron para su posterior identificación. En total se obtuvieron 0.55 g de erisodina, la cual se identificó mediante su espectro de RMN¹H (Figura 19).

Cuadro 2. Contenido de alcaloides en los extractos crudos de *Erythrina coralloides*, *E. americana* y *E. herbacea*.

Espece	Alcaloides Libres en metanol	Alcaloides Liberados en metanol	Erisodina aislada (g)
<i>E. coralloides</i>	4.41 g/kg	0.943 g/kg	0.12 g
<i>E. americana</i>	7.5454 g/kg	0.9902 g/kg	0.19 g
<i>E. herbacea</i>	8.0355 g/kg	7.0106 g/kg	0.24 g
Total erisodina obtenida			0.550 g

Las diferencias en la cantidad de los extractos obtenidos de las plantas del género *Erythrina* pueden variar dentro de una misma especie; esto se debe a que son diversas las condiciones que hay en el ambiente en el que crecen como el tipo de clima, la altitud, el tipo de suelo, la estación del año y la etapa de crecimiento que hacen que las especies produzcan cantidades y concentraciones diferentes (Valencia, 1995).

Los datos obtenidos en esta investigación se ubican dentro del intervalo de 0.1-0.5% para alcaloides libres y 0.2-0.8 % para alcaloides liberados, cifras que se encuentran entre los valores reportados por otros autores que analizaron los alcaloides de otras especies del género *Erythrina* (Chawla *et al.*, 1985 y Sotelo *et al.*, 1993). Esto indicó que el método de extracción propuesto por Soto-Hernández y Jackson (1994) que fue empleado en este estudio para la obtención de alcaloides fue el adecuado.

Por otro lado, Garín-Aguilar *et al.*, (2005) reportaron la presencia de erisovina, erisodina, erisotrina, eritralina, glucoerisopina y erisopina en extractos crudos (fracción de alcaloides libres en hexano, libres en metanol y liberados) de semillas de *E. herbacea*. Los alcaloides erisodina, erisovina, erisopina y β -eritroidina se reportaron en el extracto metanólico de las semillas de *E. americana* y *E. coralloides* de forma libre o conjugada formando glucósidos (García-Mateos y Soto-Hernández, 2001). Estos estudios respaldan que las especies consideradas en esta investigación son adecuadas para la extracción de erisodina.

Diversos autores mencionan que son las semillas las que concentran la mayor cantidad de alcaloides. Por lo que en este estudio se eligieron las semillas para la obtención de erisodina (Soto-Hernández, 1989; Soto-Hernández y Jackson, 1994, García-Mateos *et al.*, 1998).

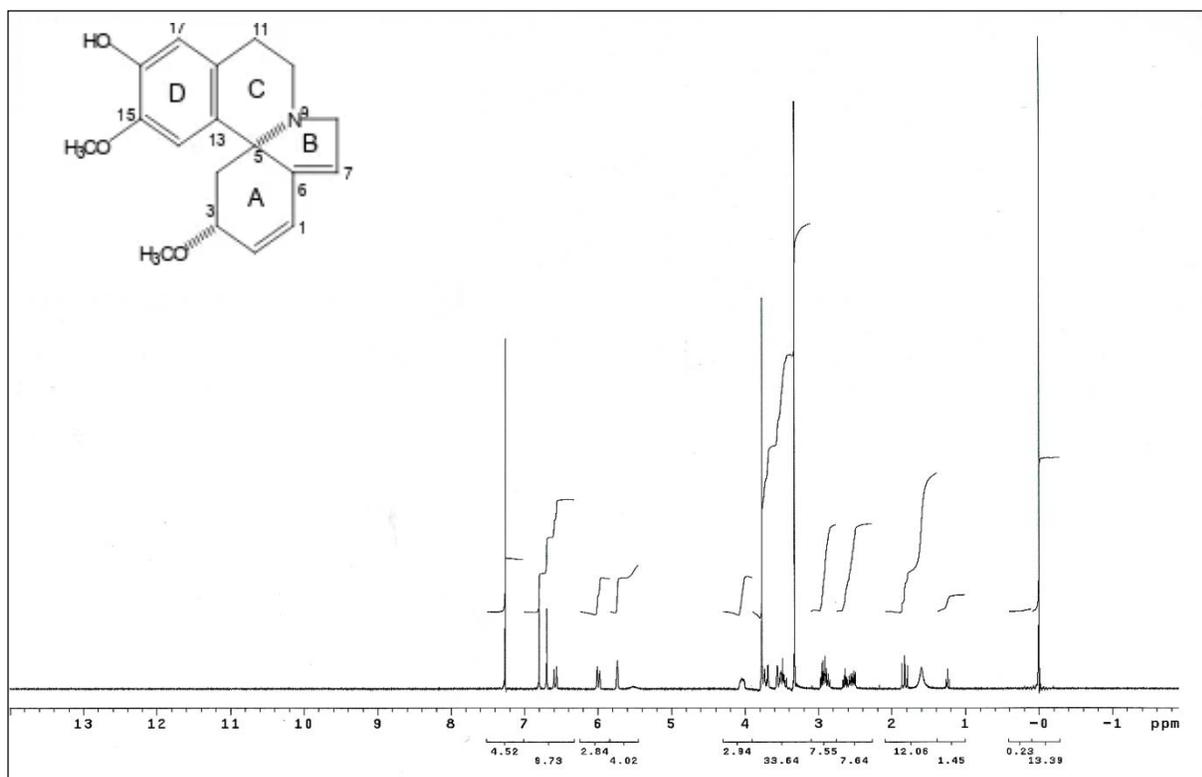


Figura 19. Espectro de RMN¹H para el alcaloide erisodina.

El análisis de RMN¹H es una técnica que permite confirmar la estructura de erisodina comparando los resultados del análisis con el software donde se muestra la estructura química de este alcaloide. En el espectro, se muestran los protones de los carbonos C-14 y C-17 de los anillos aromáticos. Así también se muestran 2 dobletes en la zona de frecuencia alta del espectro los cuales corresponden a los protones 1H y 2H, en una δ de 6.04 y 6.59 respectivamente.

El 7H olefínico se observa como un singulete con δ de 5.73. Los tres protones 1H, 2H y 7H se observan como el patrón de señales llamado sistema ABX las cuales se localizan en las regiones de frecuencia alta. Lo cual es una característica típica de los alcaloides diénicos como erisodina.

La señal de 3-OCH₃ se ubica en la región δ =3.3 y en una zona de frecuencia baja se encuentran los protones del metoxilo aromático 15-OCH₃.

Cuadro 3. Desplazamientos químicos del alcaloide erisodina

PROTONES	DESPLAZAMIENTOS QUÍMICOS (δ)
1H	6.04
2H	6.59
3Ha	4.01
4Ha	1.6
4He	2.6
7H	5.73
8H	3.48
8H	3.68
10Ha	2.93
10He	3.55
11Ha	2.89
11H	2.63
14H	6.79
17H	6.69
15-OCH₃	3.77
3-OCH₃	3.32

5.2 Resultados de la prueba conductual

Se hicieron pruebas conductuales para evaluar los efectos de la administración intrahipocámpal de dos concentraciones del alcaloide erisodina (3.4 y 6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en los procesos de memoria y ansiedad con ratas usando el modelo de laberinto T elevado.

En el Cuadro 4 se muestra la media de las latencias en segundos (s) de la línea base (LB) y las evitaciones 1, 2 y 3 (EV1, EV2 EV3). En el Cuadro 5 se presenta la media de los escapes 1 y 2 (ESC 1, ESC2), parámetros evaluados para cada uno de los tratamientos durante el entrenamiento y la prueba en el modelo de laberinto T elevado.

Cuadro 4. Media de las latencias (s) de evitación (LB, EV1 y EV2) durante el entrenamiento para cada uno de los tratamientos. La línea punteada (— · · —) indica que la EV3 se llevó a cabo 24 h después del entrenamiento.

TRATAMIENTO	ENTRENAMIENTO			PRUEBA
	LB (s)	EV1 (s)	EV2 (s)	EV3 (s) 24 h después
INTACTO (INT)	14	138	176	184
SOLUCIÓN SALINA (SAL)	11	151	207	244
NICOTINA (NIC) 3.4 µg/µL	10	159	153	183
ERISODINA 1(ER1) 3.4 µg/µL	14	55	107	64
ERISODINA 2 (ER2) 6.8 µg/µL	10	11	16	7

Cuadro 5. Medias de las latencias de escape 1 y 2 en cada uno de los tratamientos. La línea punteada (— · · —) indica que el ESC2 se realizó 24 h después del entrenamiento.

TRATAMIENTO	ENTRENAMIENTO	PRUEBA
	ESC 1 (s)	ESC 2 (s) 24 h después
INTACTO (INT)	14	13
SOLUCIÓN SALINA (SAL) 1 µL	15	13
NICOTINA (NIC) 3.4 µg/µL	69	11
ERISODINA (ER1) 3.4 µg/µL	79	31
ERISODINA (ER2) 6.8 µg/µL	76	32

5.3 Entrenamiento y pruebas de evitación

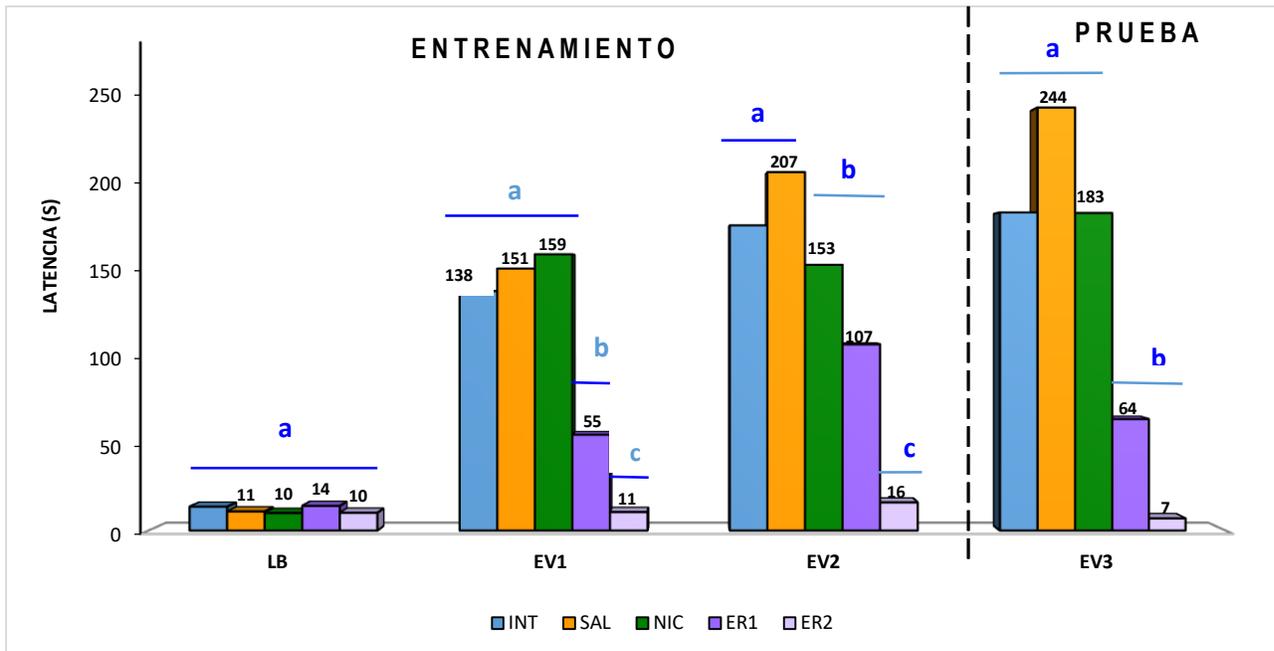


Figura 20. Latencias de retención (s) de los tratamientos en Línea Base (LB) y Evitaciones (EV1, EV2 y EV3) durante el entrenamiento y prueba en una tarea de laberinto T elevado.

Las latencias de línea base (LB), la evitación 1 (EV1), evitación 2 (EV2) y evitación 3 (EV3), obtenidas durante el entrenamiento y la prueba de cada uno de los grupos (n=9) se analizaron con una prueba de ANOVA de una sola vía.

El análisis muestra que no hubo diferencias significativas entre las latencias de la LB [$F_{(4,40)}=1.461$, $p= 0.232$] de los tratamientos INT, SAL, NIC, ER1 y ER2. Todos los valores fueron cortos (10-14 s), lo que indica que los animales se desplazaron rápidamente desde brazo cerrado a cualquiera de los brazos abiertos, desplegando actividad similar ante la primera exposición al laberinto T. Evidenciando que la administración de los tratamientos no afectó la conducta exploratoria inicial, de todos los sujetos durante el entrenamiento (Figura 20).

La prueba ANOVA, indicó diferencias significativas en EV1 [$F_{(4,40)}=4.496$, $p=0.004$]. La prueba *post hoc* de Duncan formó 3 grupos: el primero conformado por los tratamientos INT, SAL y NIC, el segundo por ER1 y un tercer grupo con el tratamiento ER2. Se

observa que en la EV1 los animales de los grupos INT, SAL y NIC permanecieron más tiempo (138, 151, 159 s, respectivamente) en el brazo cerrado; mientras que los animales a los que se les administró ER1 y ER2 presentaron latencias menores (55 y 11 s, respectivamente), desplazándose más rápidamente al brazo abierto y el tiempo más corto lo presentó el grupo con la dosis más alta de erisodina (6.8 µg/µL), este grupo se desplazó tan rápido (11 s) como lo hizo en la LB (10 s). El desplazamiento rápido al brazo abierto en estos dos últimos grupos es evidencia de un posible efecto ansiolítico de erisodina.

En la EV2 el ANOVA mostró diferencias significativas [$F_{(4,40)}= 6.557$, $p=0.0001$] y la prueba de Duncan formó nuevamente tres grupos integrados por: a) INT y SAL, b) NIC y ER1 y un tercer grupo c) con ER2. Estos datos evidencian que el grupo de NIC (153 s) y ER1 (107 s) terminaron desplazándose al BA, presentando latencias significativamente menores a INT (176 s) y SAL (207 s). Aquí se confirma el efecto ansiolítico de NIC y ER1, además del fuerte efecto ansiolítico de ER2 (16 s).

La EV1 como en la EV2 el ANOVA indicó que existen diferencias significativas entre los grupos que recibieron las dosis de erisodina (ER1 y ER2), los animales que recibieron la dosis más alta de este alcaloide se desplazaron más rápidamente desde el brazo cerrado al brazo abierto y no lo evitan. Estos datos sugieren probablemente un mayor efecto ansiolítico del tratamiento con erisodina administrada a una concentración de 6.8 µg/µL y por lo tanto un efecto ansiolítico dosis dependiente.

Es evidente que erisodina en sus dos concentraciones ER1 (3.4 µg/µL) y ER2 (6.8 µg/µL) presentaron latencias bajas en la EV1 y EV2, sugiriendo que con estas dosis los animales no evitaron el BA, por lo que este estímulo aversivo (espacio abierto y elevado) no generó en ellos miedo aprendido o condicionado, miedo que en este modelo se encuentra relacionado con la ansiedad generalizada (Zangrossi y Graeff, 1997).

Estos resultados no son consistentes con los encontrados por Flores-Hernández (2004) en donde la administración de erisodina (0.9 mg/kg IP.) no tuvo efecto ansiolítico en el modelo de laberinto T.

También discrepan de los resultados obtenidos por Decker *et al.* (1995) quienes administraron 30 $\mu\text{mol/kg}$ (ip) de este alcaloide a ratas entrenadas en el modelo de laberinto + elevado. Los autores reportaron que el alcaloide erisodina por sí solo, no afectó el tiempo gastado en el BA, pero tampoco fue capaz de antagonizar los efectos de la nicotina.

Los hallazgos de esta investigación son consistentes con el estudio de Rodrigues-Serrano *et al.* (2011) quienes aislaron erisodina y erisotrina de flores de *E. suberosa* encontrando que en el Laberinto Elevado en Cruz únicamente erisodina a una concentración de 10 mg/kg vía oral presentó efecto ansiolítico; mientras que en el modelo de transición luz-obscuridad, ambos alcaloides (erisodina 10 mg/kg y erisotrina 3 mg/kg) presentaron efecto ansiolítico.

Estas inconsistencias y consistencias entre los estudios pueden explicarse en términos de la dosis, la vía de administración, así como del modelo conductual usado en la evaluación (Bettany y Levin, 2001).

Para estudiar los efectos de los tratamientos sobre la memoria, en el modelo de laberinto T elevado, la EV3 se evaluó 24 horas después del entrenamiento. El ANOVA indicó diferencias significativas entre los tratamientos [$F_{(4,40)}=13.320$, $p=0.0001$], y de acuerdo a la prueba post hoc de Duncan, se formaron 2 grupos: el primer grupo conformado por los tratamientos INT, SAL y NIC con latencias de 184, 244 y 183 s respectivamente y el segundo grupo integrado por los grupos que recibieron ER1 y ER2 los cuales mostraron latencias de 64 y 7 s respectivamente. Estos resultados muestran que los animales con los tratamientos INT, SAL y NIC al ser colocados en el laberinto, permanecieron más tiempo en el BC evitando salir hacia el BA. Este comportamiento de las ratas puede ser interpretado que los sujetos, ya sin el efecto de los tratamientos, retienen la información aprendida durante el entrenamiento, que en el BA existe un espacio que podría representar peligro para éstas. Es evidente que la administración de 3.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ del agonista nicotina administrada en el hipocampo dorsal no deterioró la memoria en el Laberinto T elevado.

Por otro lado, los animales que recibieron erisodina en dosis de 3.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ al ser colocados en el BA permanecieron poco más de un minuto para posteriormente abandonar el BC y salir al BA, mientras que aquellos animales que recibieron erisodina a una dosis de 6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ al ser colocados en el BC se desplazaron hacia el BA de forma inmediata. Se sugiere que las dosis del antagonista erisodina (3.4 ó 6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) provocaron un deterioro de la consolidación de la memoria en la tarea de evitación inhibitoria.

Los resultados de este trabajo son consistentes con lo reportado en la investigación previa realizada por Flores-Hernández (2004) quien administró erisodina por vía ip y encontró también que este antagonista deterioró la retención de la evitación al brazo abierto (EV3) del laberinto T elevado.

Nuestros resultados también son consistentes con los obtenidos por Ruiz-López (2012), quien reportó que al administrar el antagonista erisopina, otro alcaloide aislado de semillas de *E. americana*, en dosis de 0.5 mg/kg por vía ip. ocasionó un deterioro en la evitación EV3 al BA. En general, los antagonistas de receptores nicotínicos neuronales, deterioran la memoria de tareas en modelos conductuales, en específico cabe señalar que erisodina y erisopina son antagonistas nicotínicos que tienen la misma estructura química base, ambos son alcaloides diénicos y encuentran presentes en especies del género *Erythrina* (Barakat *et al*, 1977; Chawla y Jackson, 1989).

En otro estudio realizado por Garín-Aguilar y colaboradores en el 2009, se observó que la administración de erisodina (1 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ /lado) en el hipocampo dorsal de ratas, deterioró la consolidación de la memoria en una tarea de evitación inhibitoria, señalando que este deterioro se debe a la alta afinidad que presenta erisodina a los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$. Así, el deterioro durante la EV3 observado en el Laberinto T elevado, pueda explicarse también por el bloqueo que erisodina ejerce sobre estos receptores.

Por otro lado, Nott y Levin (2006), administraron en el hipocampo dorsal de ratas metilcaconitina (antagonista de receptores $\alpha 7$) o DH β E (antagonista de receptores $\alpha 4\beta 2$), antes de correrlas en un laberinto radial de 16 brazos. Los animales recibieron

infusiones agudas de DH β E (0, 1.69, 3.38 y 6.75 μ g/lado) y MLA (6.75 μ g/lado) solas y en combinación en un diseño de medidas repetidas. Estas dosis administradas en el hipocampo dorsal aumentaron significativamente los errores de la memoria de trabajo, evidenciando la importancia que juegan los receptores nicotínicos de acetilcolina α 4 β 2 y α 7 en el hipocampo dorsal para la función cognitiva espacial motivada por el apetito. Estos resultados obtenidos concuerdan con los de la presente investigación, ya que al utilizar erisodina, alcaloide 7 veces más potente que DH β E, ocasionó también un deterioro de la memoria en la EV3.

En otras investigaciones se ha mostrado que los receptores α 4 β 2 están ampliamente implicados en las funciones cognitivas (Barros *et al.*, 2004) en donde los autores administraron los antagonistas de nAChR, mecamilamina (1, 3 y 10 μ g/lado), dihidro- β -eritroidina (DH β E; 2, 6 y 18 μ g/lado) y el agonista nicotina (0,6, 1 y 3 μ g/lado) en la región CA1 del hipocampo dorsal, en una tarea de evitación inhibitoria; en esta investigación se demostró que los receptores α 4 β 2 participan: a) La adquisición, cuando el antagonista DHBE se administró 15 minutos antes del entrenamiento; b) La consolidación, cuando DHBE se administró inmediatamente después del entrenamiento y c) La evocación de memoria de corto y largo plazo, administrando DHBE 15 minutos antes de la sesión de prueba.

El estudio de la participación de los receptores nicotínicos cerebrales en procesos cognitivos, ha requerido del empleo de diferentes fármacos agonistas o antagonistas a esos receptores. Así, mecamilamina, es una sustancia que permite demostrar que los receptores nicotínicos α 3 β 2 participan en la adquisición, consolidación y evocación de memoria de corto y largo plazo de una tarea de evitación pasiva (Barros *et al.*, 2004)

Dada la alta afinidad que presenta erisodina a los receptores nicotínicos α 4 β 2, es posible que la respuesta obtenida en la EV3 pudiera deberse al bloqueo de estos receptores en el hipocampo por erisodina con ambas dosis, ya que se ha demostrado que α 4 β 2 está ampliamente implicado en las funciones cognitivas debido a la interacción química entre erisodina y los receptores α 4 β 2, aunque las latencias producidas por el tratamiento con ER2 fueron mucho menores (7 s) que con ER1 (64 s), con lo cual se asume que a una mayor dosis el efecto ansiolítico aumenta.

Garín y colaboradores (2009), administraron en el hipocampo ventral nicotina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{min}$), DH β E (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{min}$), erisodina (2 ó 6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}/\text{min}$) o solución salina isotónica (1 $\mu\text{L}/\text{min}$) en una tarea de evitación inhibitoria reportaron que, nicotina no tuvo efecto sobre la consolidación de la memoria, mientras que DH β E y erisodina, antagonistas de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, deterioraron la memoria de la tarea. Los autores concluyeron que los receptores $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral juegan un papel importante en el proceso de consolidación de la memoria. Estos datos son consistentes con los obtenidos aquí con el modelo de Laberinto T elevado (EV3) en donde las latencias bajas durante la prueba, evidencian un deterioro en la consolidación de la memoria.

5.4 Escape en entrenamiento y prueba

5.4.1 Escape 1 (entrenamiento)

En la Figura 21 se observa la gráfica de las medias de las latencias de escape obtenidas durante el entrenamiento y la prueba. El ANOVA muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos del entrenamiento en el ESC 1 [$F_{(4,40)}=2.655$, $p=0.047$], de tal forma que al aplicar la prueba post-hoc de Duncan se formaron dos grupos. El primer grupo quedó integrado por los tratamientos INT y SAL los cuales presentaron latencias de escape bajas (14 y 15 s respectivamente) y un segundo grupo por NIC, ER1 y ER2, los cuales presentaron latencias promedio de 69, 79 y 76 s respectivamente.

Los resultados del ESC1 evidenciaron el potencial ansiolítico de ER1, ER2 (3.4 ó 6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y NIC (3.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) que permanecieron más tiempo en el BA que los sujetos de los grupos control (INT y SAL). Cabe resaltar que, el efecto ansiolítico sobre el trastorno de pánico ejercido por ER1 y ER2 fue similar al obtenido con la administración de NIC.

Este efecto ansiolítico encontrado para NIC, ER1 y ER2 en este estudio, es consistente con lo reportado en 2012 por Ruíz-López quien informó el efecto ansiolítico sobre el trastorno de pánico con NIC (0.3 mg/kg ip) y erisopina (0.5 mg/kg ip). Cabe señalar que, erisopina es clasificado como un alcaloide diénico que se encuentra presente en

especies del género *Erythrina* y comparte con erisodina la misma estructura química base.

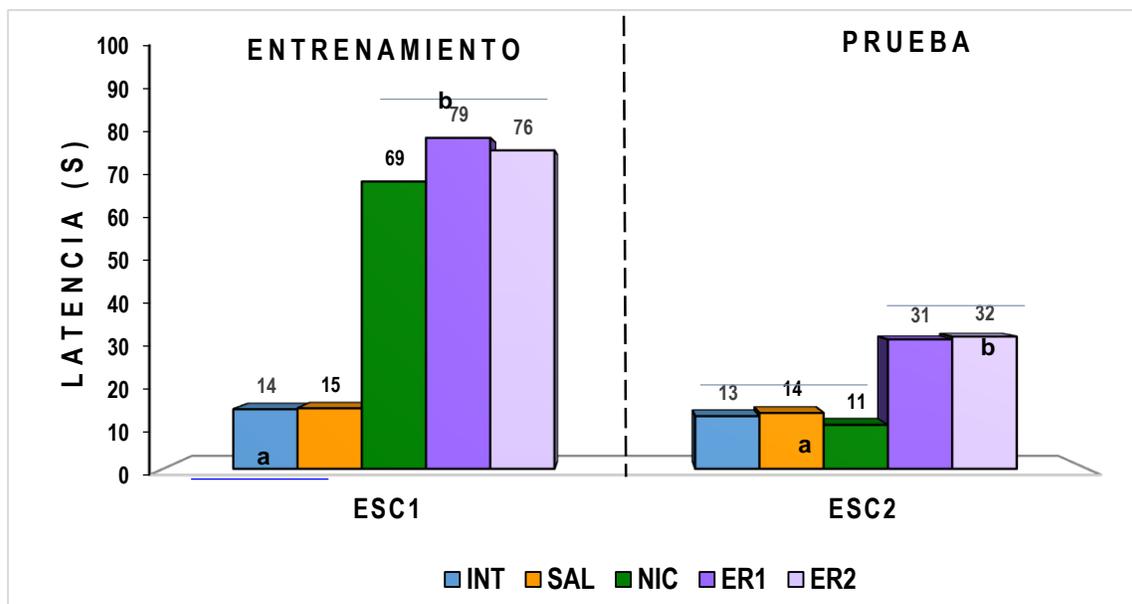


Figura 21. Latencias de retención de los tratamientos escape en el entrenamiento y prueba en una tarea de laberinto T elevado.

En este estudio, los sujetos experimentales que formaron los grupos INT y SAL, presentaron latencias bajas en el escape ESC1 durante el entrenamiento, reflejando el miedo innato a los espacios abiertos y elevados. Se ha señalado que, cuando un organismo detecta amenazas del ambiente, se activan una serie de respuestas endocrinas, metabólicas, inmunes y periféricas que permiten responder ante las situaciones que alteran su homeostasis (Lupien *et al.*, 2009).

El efecto ansiolítico de la nicotina reportado en este estudio ya fue evidenciado en otros estudios como el de Tucci *et al.* (2003) en un modelo de interacción social en ratones, cuyo efecto se asocia en particular con las subunidades $\alpha 7$ en los receptores colinérgicos nicotínicos neuronales (nAChR) del hipocampo dorsal de roedores.

La administración de DH β E ha sido documentada en donde se muestra un deterioro en tareas de laberinto y evitación inhibitoria (Barros *et al.*, 2004; Levin *et al.*, 2002; Levin y Alexi, 2006). Además, los estudios han demostrado que este fármaco no es selectivo únicamente para $\alpha 4\beta 2$, sino que además se une competitivamente a

receptores del subtipo $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ y $\alpha 7$ (Sharples y Wonnacott, 2001). Por otro lado, se ha señalado que erisodina es un antagonista selectivo siete veces más a fin al receptor $\alpha 4\beta 2$ que DH β E (Decker, 1995), por lo cual la administración en el hipocampo dorsal permitió evidenciar el papel que juega este alcaloide en la ansiedad al someterla al escape en el entrenamiento.

Con respecto a los resultados del efecto ansiolítico de erisodina que se muestra en este estudio, concuerdan con los encontrados por Serrano y colaboradores (2011), quienes aislaron erisodina y erisotrina de flores de *E. suberosa* y les fueron suministrados de forma oral a ratones suizos en dosis de 3 y 10 mg/kg, además de incluir en el estudio un grupo de control positivo que recibió una inyección intraperitoneal de diazepam (DZP, 2 mg/kg). Para ello, los sujetos experimentales fueron expuestos a una prueba conductual de Laberinto en Cruz y a un modelo de transición luz-oscuridad. Los resultados demostraron que el tratamiento con erisodina y erisotrina, produjeron efecto ansiolítico en ratones expuestos a éstas dos pruebas para evaluar ansiedad, aunque las dosis utilizadas en esta investigación doctoral fueron más bajas ya que el área de administración fue directamente en el hipocampo, el efecto ansiolítico de la erisodina fue evidente en la prueba del laberinto T elevado.

En otras investigaciones se ha confirmado que existe evidencia que sugiere que las especies del género *Erythrina* tienen efectos ansiolíticos, tal es el caso de Flausino *et al.*, (2007) quienes reportan que la administración oral a ratones con dosis de 3-10 mg/kg de los alcaloides 11- α -hidroxeritravina, eritravina y α -hidroxerisotrina, deterioraron la adquisición de evitación inhibitoria cuando son colocados en los brazos abiertos en el laberinto en T elevado; así también Flausino y colaboradores (2007b) encontraron que la administración oral con los alcaloides eritravina y 11- α -hidroxeritravina en ratones suizos a una dosis de 3-10 mg/kg produjeron efectos ansiolíticos en el modelo de transición luz oscuridad. Se basa en el conflicto que tiene el ratón entre el comportamiento exploratorio y la aversión innata que tiene hacia el área que se encuentra abierta e iluminada (brillante) de esta evaluación, así un aumento en el tiempo de permanencia en el lado iluminado, se considera como un indicativo de la reducción en la ansiedad (Rejón-Orantes *et al.*, 2011).

5.4.2 Escape 2 (Prueba)

Los resultados del ESC 2 se muestran en la Figura 21. El ANOVA encontró diferencias significativas entre los tratamientos [$F_{(4,40)}=6.636$, $p=0.0001$] y la prueba post-hoc de Duncan formó 2 grupos: el primero conformado por los tratamientos INT, SAL y NIC con latencias de 13, 14 y 11 s respectivamente y un segundo grupo integrado por ER1 y ER2 con 31 y 32 s de latencia. Se observa que después de 24 horas de la administración de los tratamientos, es decir cuando los animales ya no se encuentran bajo el influjo de los fármacos, los grupos INT, SAL y NIC se desplazaron rápidamente desde el BA al BC escapando del estímulo aversivo; mientras que los animales a los que se les administró erisodina en ambas dosis (3.4 ó 6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), permanecieron más tiempo en el BA antes de regresar al BC. Esto puede interpretarse como un posible deterioro de la memoria del evento aversivo, ocasionado por el antagonista erisodina.

Los resultados del ESC2 indican que en los grupos INT, SAL y NIC no hubo interferencia con la memoria del miedo incondicionado o innato que presentan los roedores a los espacios abiertos y elevados. Estos datos concuerdan con los encontrados por Flores-Hernández (2004) quien reportó que la administración vía ip de nicotina (0.3 mg/kg) no afectó la memoria del miedo incondicionado. Por otro lado, el deterioro de la memoria del miedo innato provocado por la administración de ER1 y ER2 (3.4 ó 6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en el hipocampo dorsal, también concuerdan con los hallazgos de Flores-Hernández (2004) quien reportó deterioró de la memoria del estímulo aversivo cuando erisodina (0.9 mg/kg) se administró por vía oral.

Por otro lado, los datos de ESC2 evidenciaron que ER1 y ER2 (3.4 ó 6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) deterioraron la memoria del evento aversivo; en contraste en el estudio de Ruíz-López (2012) erisopina (0.5 mg/kg ip.) no deterioró esta memoria aun cuando mostró efecto ansiolítico durante el ESC1. Estas inconsistencias en el efecto sobre la memoria se pueden explicar en términos de la vía de administración de los tratamientos y las dosis, factores determinantes en el efecto de los fármacos (Hernández-Chávez, 2014).

Los estudios de los receptores nicotínicos y el papel que desempeñan en la función cognitiva se ha basa principalmente en los receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$, debido a la disponibilidad que tienen los antagonistas selectivos DH β E y metilcaconitina (MLA) para estos subtipos. De tal forma que, el receptor $\alpha 4\beta 2$ en el hipocampo se ha implicado en la liberación de acetilcolina; y por otro lado el receptor $\alpha 7$ tiene relación con el desarrollo neuronal y la regulación del crecimiento (Chan y Quik, 1993), estos receptores son importantes en la memoria y aprendizaje. Sin embargo, cuando DH β E y MLA se presentan en altas concentraciones de hasta 92 $\mu\text{g/lado}$, pueden afectar a ambos receptores, es por ello que se han usado bajas dosis para una mayor discriminación entre ellos (Bettany y Levin, 2001). De tal forma que es importante el uso de bajas dosis en donde pueda evidenciarse el papel de desempeñan en los procesos cognitivos, los receptores.

El hecho de que en esta investigación se haya evidenciado el efecto ansiolítico de ER1 (3.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y ER2 (6.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) sobre el trastorno de ansiedad generalizada (EV1 y EV2) y sobre el trastorno de pánico (ESC1); así como el deterioro en la memoria para evitar (EV3) o escapar (ESC2) del estímulo aversivo, permiten proponer a este alcaloide como antagonista de receptores nicotínicos que modulan los procesos de memoria y ansiedad. Es necesario evaluar el efecto de erisodina en un intervalo amplio de dosis para verificar cual es el efecto de este alcaloide a concentraciones mayores en procesos cognitivo-afectivos.

Se sugiere verificar en estudios conductuales, el papel de los receptores $\alpha 3\beta 4$ a los que erisodina también presentó afinidad en experimentos *in vitro* de acuerdo con los estudios realizados por Decker *et al.* (1995), debido a que estos receptores se les encuentran presentes en el hipocampo y se han implicado en la potenciación a largo plazo (LTP), así como en la base de los cambios plásticos que se asocian a la memoria y a el aprendizaje (Matsuyama *et al.*, 2003).

Los resultados de esta investigación soportan lo propuesto en Garín-Aguilar *et al.* (2009), quienes ya señalaron la importancia de realizar investigaciones con otros alcaloides del género *Erythrina*, en donde se identifique el papel básico de los receptores $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$. Así se han planteado ser blancos terapéuticos potenciales en

enfermedades neuronales como epilepsia, y en una gran cantidad de desórdenes de tipo psiquiátricos y neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, el síndrome de Tourette, la esquizofrenia, inclusive para tratamientos contra el dolor y por supuesto la ansiedad y la depresión.

VI. CONCLUSIÓN

El espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-H¹) permitió elucidar la estructura química de erisodina aislada de semillas del género *Erythrina* siendo *E. herbacea* la especie de la cual se obtuvo un mayor rendimiento, por ello se seleccionó esta especie para aislar ésta sustancia.

El modelo de laberinto T permitió evidenciar el efecto ansiolítico de nicotina (3.4 µg/µL) disminuyendo la ansiedad generalizada sólo en la EV2.

Nicotina no deterioró la memoria del miedo aprendido o condicionado (EV3).

Erisodina (6.8 µg/µL) (ER2) presentó un mayor efecto ansiolítico en la fase de entrenamiento en el Laberinto Elevado en T (EV1 y EV2).

Erisodina en ambas dosis (3.4 ó 6.8 µg/µL), presentó efecto ansiolítico durante el entrenamiento y este efecto fue dependiente de la dosis.

Erisodina deterioró de la memoria de la ansiedad generalizada y el miedo incondicionado generados en el laberinto T elevado.

Se presentaron bajas latencias, con ambas dosis de erisodina administrada, en la evitación al brazo abierto (EV3) y del ESC2 lo cual demuestran que existe un deterioro de la memoria sobre el miedo incondicionado.

Los incrementos significativos en las latencias de ESC1 (asociado al trastorno de pánico) ocasionados con la administración de erisodina y nicotina confirman el efecto ansiolítico de estos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el papel de los receptores nicotínicos α4β2 en la modulación de los procesos de ansiedad y memoria.

VII. LITERATURA CITADA

- Aguilar, C. A. & Zolla, C. (1982). *Plantas tóxicas de México*. Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Aguilar, H. & Aguilar, R. (2011). Estudio preliminar sobre la biodiversidad asociada al Bucare Ceibo *Erythrina Poeppigiana* (Walp) O. F. Cook. (Leguminosa: Papilionoideae) en el estado Mérida, Venezuela. *Rev. Ecol. Lat. Am*, 16(2-3), 1-19. ISSN 1012-2494.
- Aguilar, M. I., Giral, F. & Espejo, O. (1981). Alkaloids from the flowers of *Erythrina americana*. *Phytochemistry*, 20, 2061-2062. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(81\)84079-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(81)84079-4)
- Aguirre, Z., Loja, A., Solano, M. & Aguirre, N. (2015). *Especies Forestales más aprovechadas del Sur del Ecuador*. Universidad Nacional de Loja. Ecuador.
- Amaral, D. G. & Witter, M. P. 1989. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31, 571-591. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(89\)90424-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7)
- Andersen, P. (2007). *The hippocampus book*. Oxford University Press.
- Araki, H., Suemaru, K. & Gomita, Y. (2002). Neuronal nicotinic receptor and psychiatric disorders: Functional and Behavioral Effects of Nicotina. *Journal Pharmacology*, 88,133-138 <https://doi.org/10.1254/jjp.88.133>
- Ariza, W., Huertas, C., Hernández, A., Geltvez, J., González, J. & López, L. (2010). Caracterización y usos tradicionales de productos forestales no maderables (PFNM) en el corredor de conservación Guantiva-La Rusia-Iguaque. *Colombia forestal*, 13(1), 117-140. <http://hdl.handle.net/11349/17766>
- Ashby, F. G., Turner, B. O. & Horvitz, J.C. (2010). Cortical and basal ganglia contributions to habit learning and automaticity. *Trends Cogn Sci*, 14, 208-15. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.02.001>
- Ashfod, D., Lara, P., Aguilar, E., Cen, F., Ku, J., & Sanginés, J. (2017). *In vivo* digestibility and nitrogen balance in sheep diets with foliage of fodder trees in substitution for soybean meal. *Agroforestry Systems*, 91(6), 1079-1085. DOI:10.1007/s10457-016-9982-3
- Ávalos G. A. & Pérez-Urria C.E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw Hill Interamericana.
- Baddeley, A. D., & Hitch, G. J. (1994). Developments in the concept of working memory. *Neuropsychology*, 8(4), 485–493. <https://doi.org/10.1037/0894-4105.8.4.485>

- Barakat, T., Jackson, A.H. & Abdullah, M.I. (1977). Further studies of *Erythrina* alkaloids. *Lloydia*, 40, 471-475.
- Barragán S. A. (2006). La práctica de la autoatención por fitoterapia en un grupo de familias mexicanas". *Archivos en Medicina Familiar*, 8, 155-162. <https://www.redalyc.org/pdf/507/50780303.pdf>
- Barrera, E. M. (1958). *Valoración de alcaloides en el Colorín (Erythrina americana)* [tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional UNAM.
- Barros, D. M., Ramírez, M. R., Dos Reis, E. A., & Izquierdo, I. (2004). Participation of hippocampal nicotinic receptor in acquisition, consolidation, and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rat. *Neuroscience*, 126, 651- 656. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.03.010>
- Bennett, R. N. & Wallsgrove, M. R. (1994). Secondary metabolites in plant defense mechanisms. *New Phytol*, 127, 617-633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Bettany, J. H. & Levin, E. D. (2001). Ventral hippocampal $\alpha 7$ nicotinic receptor blockade and chronic nicotine effects on memory performance in the radial-arm maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 40(4), 467-474. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00643-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00643-8)
- Bonilla, J. (2013). *Determinación de la toxicidad, actividad sedante y ansiolítica del extracto acuoso de las flores de Erythrina berteroana (pito) en ratones NIH*, [tesis de licenciatura, Universidad de San Salvador]. Repositorio Institucional de la Universidad de San Salvador. <https://ri.ues.edu.sv/id/eprint/3259/>
- Bowman, W. C. & Rand, M. J. (1984). *Farmacología, bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas*. Interamericana.
- Buchanan, B. B.; Gruissen, W. & Jones, R. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist.
- Burger, A. (1960). *Química Médica*. Tomo I. Aguilar, S.A.
- Buttgenbach, H.; Vargas, C. & Reynel, C. (2012). *Dinámica forestal de un bosque premontano del valle de Chanchamayo*. APRODES Asociación Peruana para la Promoción del Desarrollo Sostenible
- Buzsáki, G. & Moser, E. I. (2013). Memory, navigation, and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system. *Nat Neurosci*, 16,130–38. DOI: 10.1038 / nn.3304.
- Cárdenas, L. (2016). *Aspectos ecológicos y silviculturales para el manejo de especies forestales*. Fundación Natura.
- Carlson, N. R. (2004). *Fisiología de la conducta*. Pearson Educación.

- Catania, M. & Dell'Acqua, M. T. de S. (2013). A revised limbic system model for memory, emotion and behaviour. *Neurosci Biobehav Rev.*, 37(8),1724–37. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.07.001>
- Cedillo, I. B. (2017). Generalidades de la neurobiología de la ansiedad. *Revista Electrónica de Psicología Iztacala*, 20(1), 239-251. <https://www.iztacala.unam.mx/carreras/psicologia/psiclin/vol20num1/Vol20No1Art14.pdf>
- Chan, J. & Quik, M. (1993). A role for the nicotinic α -bungarotoxin receptor in neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroscience*, 56(2), 441-451. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(93\)90344-F](https://doi.org/10.1016/0306-4522(93)90344-F)
- Chávez, Q. E., & Roldán J. (1994). *Vivero de plantas medicinales*. Reunión Nacional de Investigación Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Chawla, A. S F. M., Redha J., & Jackson, A. H. (1985). Alkaloids in seeds of four *Erythrina* species. *Phytochemistry*, 24(8),1821-2823. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82559-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82559-5)
- Chawla, A. S. & Jackson A. H. (1989). *Erythrina* and related alkaloids. *Natural Products Reports*, 6, 55-66.
- Cheeta, S., Tucci S. & File S. E. (2001). Antagonism of the anxiolytic effect of nicotine in the dorsal raphe nucleus by dihydro-beta-erythroidine. *Pharmacol. Biochem. Behav*, 70(4), 4091-496. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00641-4](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00641-4)
- Corado, M. & Escobar, S. (2013). *Extracción y determinación de la presencia de alcaloides en flores del árbol de pito (Erythrina Generalidades del Género Erythrina berteriana)* [tesis de Técnico en Laboratorio Químico, Escuela Especializada en Ingeniería, ITCA-FEPADE El Salvador). <http://hdl.handle.net/10972/1310>
- Correa M. (2007). Neuroanatomía funcional de los aprendizajes implícitos: asociativos, motores y de hábito. *Rev Neurol*, 44(4), 234-242.
- Curzon P., Brioni, J. D., & Decker, M. W. (1996). Effect of intraventricular injections of dihydro- β -erythroidine (DH β E) on special memory in the rat. *Brain Res*, 714(1-2), 185-191. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)01536-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)01536-1)
- Damaj, M. I., Welch, S. P., & Martin, B. R. (1995). *In vivo* pharmacological effects of dihydro- β -erythroidine, a nicotinic antagonist, in mice. *Psychopharmacology*, 117(1), 67-73. DOI:10.1007 / bf02245100
- De Araújo, J., De Oliveira, M., Aquino, P., Alexandre, M. & Sant'Ana, A. (2012). A phytochemical and ethnopharmacological review of the genus *Erythrina*. En *Phytochemicals-A Global perspective of their role in nutrition and health*. (pp 327-352). Venketeshwer Rao, IntechOpen

- Decker, M. W., Majchrzak, M. J., & Arneric, S. P. (1993). Effects of lobeline, a nicotinic receptor agonist, on learning and memory. *Pharmacol Biochem Behav*, *45*, 571-576. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90508-Q](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90508-Q)
- Decker, W. M., Anderson, J. D., Brioni, J. D., Donnelly-Roberts, D. L., Kang, H. C., O'Neill, A. B., Piattoni-Kaplan, M., Swanson, S. & Sullivan, J. P. (1995). Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of pharmacology*, *80*, 79-89. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(95\)00191-M](https://doi.org/10.1016/0014-2999(95)00191-M)
- Escamilo, S. (2012). El Pajuro (*Erythrina edulis*) alimento andino en extinción. *Investigaciones Sociales*, *16*(28), 97-104. <https://doi.org/10.15381/is.v16i28.7389>
- Evans, W. C. 1991. *Farmacognosia. Trease & Evans*. Interamericana-McGraw-Hill.
- Farfán, F. (2012). *Arboles con potencial para ser incorporados en sistemas agroforestales con café*. FNC-Cenicafé.
- Farfán, F., Baute, J., Menza, H. & Sánchez, P. (2016). *Erythrina spp. para sistemas agroforestales con café*. Gerencia Técnica / Programa de Investigación Científica Fondo Nacional del Café.
- Fasce, E. (2008). *Bases neurobiológicas del aprendizaje*. Boletín de la Academia Chilena (pp 123-138). Universidad de Chile.
- Fernández, R. (2010). Importancia y ventajas de *Erythrina* sp. en sistemas agroforestales. *Xilema*, *23*(1), 51-55. <http://dx.doi.org/10.21704/x.v23i1.690>
- Fernández-Castillo, A. & Gutiérrez, R. M. (2009). Atención selectiva, ansiedad, sintomatología depresiva y rendimiento académico en adolescente. *Electronic Journal of Research in Educational Psychology*, *7*(1), 49-76. <https://www.redalyc.org/pdf/2931/293121936004.pdf>
- File, S. E. (1993). The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav Brain Res*, *58*,199-202. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(93\)90103-W](https://doi.org/10.1016/0166-4328(93)90103-W)
- Flausino Jr, O. A., Pereira, A. M., Bolzani, V. S., & Nunes-de-Souza, R. L. (2007a). Effects of erythrinan alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *30*(2), 375-378. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.375>
- Flautino, O., Santos, L. D. A., Verli, H., Pereira, A. M., Bolzani, V. D. S, & Nunes-de-Souza R. L. (2007b). Anxiolytic effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina mulungu* *Journal of Natural Products*, *70*(1), 48-53. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.08.009>
- Flores, S. M. E. & Segura T. J. E. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Revista mexicana de neurociencias*, *6*(4), 315-326. <http://previous.revmexneurociencia.com/wp-content/uploads/2014/06/Nm054-05.pdf>

- Flores-Hernández, L. (2004). *Estudio comparativo del efecto de erisodina y nicotina sobre una tarea en laberinto T elevado* [tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional de la UNAM. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/289067>.
- Folkers, K. & Major R. T. (1937). Isolation of erythroidine, an alkaloid of curare action, from *Erythrina americana* Mill. *Journal of the American Chemical Society*, 59(8),1580-1581.
- Gagliardi, S., Martin, A., Virginio, E., Rapidel, B. & Isaac, M. (2015). Intraspecific leaf economic trait variation partially explains coffee performance across agroforestry management regimes. *Agriculture, Ecosystems y Environment*, 200, 151-160. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.11.014>
- Games, D. E., Jackson, A. H., Khan, N. A., & Millington, D. S. (1974). Alkaloids of some African, Asian, Polynesian and Australian species of *Erythrina*. *Lloydia*, 37, 581-588.
- García-Martínez, G. (2010). *Participación de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral de rata en el aprendizaje de evitación* [tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México] Repositorio Institucional de la UNAM. http://132.248.9.195/ptb2010/noviembre/0664190/0664190_A1.pdf
- García-Mateos, R., Soto-Hernández, M. & Vibrans, H. (2001). *Erythrina americana* Miller ("colorin"; Fabaceae), a Versatile Resource from Mexico: a Review. *Economic Botany*, 55(3), 391-400. DOI:10.1007/BF02866562
- García-Mateos, R., Soto-Hernández, M., Martínez-Vázquez, M. & Villegas-Monter A. (1998). Isolation of Alkaloids of *Erythrina* from Tissue Culture. *Phytochemical Analysis*, 10, 12-16. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199901/02\)10:1<12::AID-PCA425>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199901/02)10:1<12::AID-PCA425>3.0.CO;2-A)
- García-Mendoza, M. N. (2015). *Efecto del antagonista nicotínico erisodina sobre la consolidación de la memoria* [tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México] Repositorio Institucional de la UNAM. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/122588>
- Garín-Aguilar, M. E., López, V. S., Martínez, V. C., Valencia del T., G., Soto H. M. & Prado A. R. A. (2009). Erisodina y receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo dorsal en la consolidación de la memoria. *Rev. Latinoam. Quím*, 37(3),206-217. https://www.researchgate.net/profile/Gustavo-Valencia-Del-Toro-2/publication/328117805_erisodina_y_receptores_nicotinicos_a4b2_del_hipocampo_dorsal_en_la_consolidacion_de_la_memoria/links/5bb83ae0a6fdcc9552d4781c/erisodina-y-receptores-nicotinicos-a4b2-del-hipocampo-dorsal-en-la-consolidacion-de-la-memoria.pdf
- Garín-Aguilar, M. E., Martín F. J. A., Hernández R. A. G., Valencia del T., G., Soto-Hernández M. & Prado-Alcalá R. A. (2009). Receptores $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral y consolidación de la memoria. *Planta Med*, 74 -PA32.

- Garín-Aguilar, M. E., Valencia-del Toro G., Soto-Hernández, M. & Kite, G. (2005). High-performance liquid chromatography–mass spectrometric analysis of alkaloids extracted from seeds of *Erythrina herbacea*. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 16(5), 302-306. <https://doi.org/10.1002/pca.821>
- Gelder, M., Gath, D., Mayou, R., & Cowen P. (1996). Mood disorders. En *Oxford Textbook of Psychiatry* (pp 197–245). Oxford University.
- Gómez, B. G. (2007). Neurofisiología de la ansiedad, versus la angustia como afecto que se siente en el cuerpo, *Informes Psicológicos*, 9, 101–119. <http://pepsic.bvsalud.org/pdf/ipsi/n9/v9n9a06.pdf>
- Goodman, L. S., & Gilman A. (2006). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. McGraw-Hill Interamericana.
- Gould, D., Reeleaf G. C., & Krane, V. (2002). Arousal anxiety and sport behavior. En *Advances In Sport Psychology*. (pp 207-241) Champaign Ill: Human Kinetics.
- Grados, M., & Peláez, F. (2012). Especies vegetales utilizadas por pobladores de Berlín, Bagua Grande (Amazonas, Perú) 2011- 2012. *Rebiolest*, 2, 36. https://www.researchgate.net/profile/Malena-Grados-Vasquez/publication/308263812_Especies_vegetales_utilizadas_por_pobladores_de_Berlin_Bagua_Grande_Amazonas_Peru_2011-2012/links/57df68b308ae5292a37f50bc/pdf
- Granados, J., Ruiz, L., & Forero, E. (2005). Sinopsis de las especies colombianas del género *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). En *Estudios en leguminosas colombianas* (pp. 359-394) Universidad Nacional de Colombia.
- Guerrero, L. M. (1980). *Estudio comparativo, composición química y los factores tóxicos de dos variedades de Erythrina (E. breviflora y E. americana)* [tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio institucional de la UNAM.
- Guevara, J., Suca, C., Suca, F. y Barbachan, H. (2014). Análisis sensorial de carne de cuyes alimentados con dietas suplementadas con harina de pajuro (*Erythrina edulis*)-UNMSM. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 17(1), 59-62. <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/11315>
- Guyton, A. C. (2001). *Tratado de Fisiología Médica*. Mc Graw Hill Interamericana S.A.
- Guzmán, R. (2010). *Evaluación de Bloques Multinutricionales para Ovinos Elaborados a Partir de Desechos Agroindustriales de Euterpe oleracea y Follajes de Gliricidia sepium, Erythrina fusca y Eichhornia crassipes* [tesis doctoral, Universidad de Oriente]. Repositorio Institucional de la UN. <https://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnl02m827.pdf>

- Haberer, J. P. (2017). Farmacología de los curares. *EMC–Anestesia Reanimación*, 43(4),1-27.
- Hajós-Korcsok, E., Robinson, D. D., Yu, J. H., Fitch, C. S., Walker, E. & Merchant, K. M. (2003). Rapid habituation of hippocampus serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated foot shock stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 74: 609-616. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(02\)01047-X](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(02)01047-X)
- Handley, S. L. & McBlane, J. W. (1993). 5-HT drugs in animal models of anxiety. *Psychopharmacology Berlin*, 112(1), 13-20. DOI:10.1007 / bf02245590
- Hargreaves, R.T., Johnson, R. D., Millington, D.S., Mosal, M.H., Breavers, W., Becker, L., Young, C. & Rinehart, K. L. Jr. (1974). Alkaloids of american species of *Erythrina*. *Lloydia*, 37, 569-580.
- Hastings, R. B. (1990). Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, Papilionoideae, Part one. *Economic Botany*, 44(3), 336-348.
- Henke, P. G. (1990). Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer development. *Brain Research Bulletin*, 25, 691-695.
- Hernández-Chávez, A. (2014). *Farmacología General: una guía de estudio*. McGraw-Hill Interamericana S.L.
- Hill, J. W. & Kolb, D. K. (1999). *Química para el nuevo milenio*. Prentice Hall-Hispanoamericana-Pearson.
- Hummel, F., Andres, F., Altenmuller, E., Dichgans, J., & Gerloff, C. (2002). Inhibitory control of acquired motor programmes in the human brain. *Brain*, 125, 404-20. <https://doi.org/10.1093/brain/awf030>
- Kandel E. R. & Siegelbaum S. A. (2000). Overview of synaptic transmission. En. *Principles of neural science* (pp175-186). McGraw-Hill, Health Professions Division.
- Katz, R. L. (1971). Clinical neuromuscular pharmacology of pancuronium. *Anesthesiology*, 34, 550-551. <https://doi.org/10.1097/00000542-197106000-00015>
- Kolb, E., & Gertz, H. A. (1976). *Fisiología veterinaria*. Vol II. Acribia.
- Krukoff, B. & Barneby, R. (1974). Conspectus of species of the genus *Erythrina*. *Lloydia*, 37(3), 332-459.
- Lehman, A. E. (1937). Actions *E. americana* a possible curare substitute. *J. Pharmacology*, 60, 69-79.
- Levin, D. E. (2002). Nicotinic Receptor Subtypes and Cognitive Function. *Developmental Neurobiology*, 53(4), 663-640. <https://doi.org/10.1002/neu.10151>

- Levin, D. E. (1992). Nicotine systems and cognitive function. *Psychopharmacology*, 108, 418-431. DOI: 10.1007 / BF02247415.
- Levin, D. E. (1996). Nicotinic agonist and antagonist effects on memory. *Drug Development Research*, 38, 188-195. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2299\(199607/08\)38:3/4<188::AID-DDR7>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2299(199607/08)38:3/4<188::AID-DDR7>3.0.CO;2-I)
- Levin, D. E., Bradley, A., Addy, N. & Sigurani, N. (2002). Hippocampal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and working memory. *Neuroscience*, 109(4), 757- 765. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00538-3](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00538-3)
- Levin, D. E., McClernon, F. & Rezvani, A. (2006). Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification and anatomic localization. *Psychopharmacology*, 184(3-4), 523-39. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0164-7>
- Leyva, J. A. (1988). *Breve historia de la Química en México: De las plantas medicinales a la Tabla periodica*. ICyT-Información.
- Lindstrom, J. (1997). Nicotinic acetylcholine receptors in health and disease. *Mol Neurobiol*, 15, 193–222. DOI: 10.1007 / BF02740634.
- López, C. R., Navarro, L. J. y Caleño, B. (2016). *Productos forestales no maderables de CORPOCHIVOR. Una mirada a los regalos del bosque*. Corporación Autónoma Regional de Chivor.
- López, M. & Briceño, E. (2017). Efecto de la especie de leguminosa y la fuente de carbohidratos en la calidad física y química de mezclas para ensilaje. *Nutrición animal tropical*, 11(1), 52-73. DOI 10.15517/NAT.V11I1.29605
- López-Rojas, J., Almaguer-Melián, W. & Bergardo-Rosado, J.A. (2007). La marca sináptica y la huella de la memoria. *Rev Neurol*, 45(10), 607-614. <http://www.publicacions.ub.es/refs/Articles/sinapsiimemoria.pdf>
- López-Varela, S. (2007). *Efecto de la administración intra-hipocampal de erisodina sobre la consolidación de una tarea de evitación inhibitoria* [tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México] Repositorio Institucional de la UNAM. <http://132.248.9.195/pd2007/0620759/Index.html>
- Lozoya, X. & Lozoya, M. (1982). *Flora medicinal de México.1. Plantas indígenas*. Instituto Mexicano del Seguro Social, IMSS.
- Machado, S., Portella, C., Silva, J. & Velásquez, B. (2008). Aprendizaje y memoria implícita: mecanismos y neuroplasticidad. *Rev Neurol*, 46(9), 543-549.
- Mansbach, S. R; Chambers, L. K., & Rovetti, C. Ch. (2000). Effects of the competitive nicotinic antagonist erysodine on behavior occasioned or maintained by nicotine: comparison with mecamylamine. *Psychopharmacology*, 148, 234-242.
- Martínez, M. (1996). *Las plantas medicinales de México*. Botas.

- Mass, W. & Campanera, M. (2011). *Arboles medicinales*. Programa de Cooperación Hispano Peruano-Proyecto Araucaria XXI Nauta.
- Matsuyama, S. & Matsumoto, A. (2003). Epibatidine induces long-term potentiation (LTP) via activation of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) *in vivo* in the intact mouse dentate gyrus: both $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nAChRs essential to nicotinic LTP. *J Pharmacol Sci*, 93, 180-187. [https://doi.org/10.1254/S1347-8613\(19\)32595-2](https://doi.org/10.1254/S1347-8613(19)32595-2)
- Merillon, J. M. y Ramawat, K. G. (1999). Mechanism and control. En *Biotechnology Secondary Metabolites* (pp. 241-256). Science Publishers, Inc.
- Meza, G., Loor, N., Sánchez, A., Avellaneda, J., Meza, C., Vera, D., Cabanilla, M., Liuba, G., Meza, J., Meza, F., Ramírez, M., Moncayo, O., Cadena, D., Villamar, R., Díaz, E., Rizzo, L., Rodríguez, J. & López, F. (2014). Inclusión de harinas de follajes arbóreos Género *Erythrina* y arbustivos tropicales (*Morus alba*, *Erythrina poeppigiana*, *Tithonia diversifolia* e *Hibiscus rosasinensis*) en la alimentación de cuyes (*Cavia porcellus* Linnaeus). *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 61(3), 258-269. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v61n3.46874>
- Mitaine-Offer, C., Sauvain, M., Valentin, A., Callapa J., Mallié, M. & Zéches- Harnot, M. (2002). Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. *Phytomedicine*, 9, 142. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00094>
- Montero, E. (2016). *Evaluación de las propiedades fermentativas, nutricionales y el costo de elaboración de ensilajes de Poró (Erythrina poeppigiana) y Cratylia (Cratylia argentea) con niveles crecientes de inclusión de guineo cuadrado (Musa sp), para alimentación de rumiantes* [tesis de licenciatura, Universidad de Costa Rica]. Repositorio de SIBDI-UCR. <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/handle/123456789/4392>
- Morgado, I. 2005. Psicobiología del aprendizaje y la memoria. *Rev Neurol*, 40, 289-97. <https://bloccs.xtec.cat/escolamargalloedu/files/2013/06/Apr-y-Mem-RN-20053.pdf>
- Morris, R. G. M. 2006. Memory reconsolidation: sensitivity of spatial memory to inhibition of protein synthesis in dorsal hippocampus during encoding and retrieval. *Neuron*, 50, 479– 89. <https://core.ac.uk/download/pdf/82438544.pdf>
- Moser, M. B., & Moser, E. I. 1998. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8, 608-619. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1063\(1998\)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1063(1998)8:6<608::AID-HIPO3>3.0.CO;2-7)
- Moser, M. B., Moser, E. I., Forrest, E., Andersen, P., & Morris, R. G. 1995. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 9697–9701. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9697>
- Nakagawa, O.M. 1991. *Determinación de la dosis letal 50% del extracto acuoso del colorín (Erythrina americana) por vía oral en ratas Spague-Dawley* [tesis de

- licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional de la UNAM. <http://132.248.9.195/pmig2018/0094028/0094028.pdf>
- Neill, D. A. (1988). Experimental studies on species relationships in *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoidae). *Annals Missouri Bot. Garden*, 75, 886-969. <https://doi.org/10.2307/2399377>
- Neill, D. A. (1993). Botany and Ecology. En *Erythrina Production and Use: A Field Manual*. Nitrogen Fixing Tree Association (NFTA).
- Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf](http://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf)
- Nott, A., & Levin, E. D. (2006). Dorsal hippocampal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and memory. *Brain Research*, 138(1), 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.052>
- Organización Mundial de la Salud. (2002). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002- 2005*. Ginebra: OMS.
- Ouagazzal, A. M., Kenny, P. J. y File, S. E. (1999). Stimulation of nicotinic receptors in the lateral septal nucleus increases anxiety. *Eur J Neurosci*, 11, 3957-3962. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00823.x>
- Paterson, D. & Nordberg, A. (2000). Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in neurobiology*, 61(1), 75-111. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00045-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00045-3)
- Paxinos, G. & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press.
- Pedrozo, J. (2004). *Productos Naturales Vegetales: Generalidades Químicas, Papel Biológico, Importancia Industrial y Métodos de uso común en fitoquímica*. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Pelletier, W (1983). The nature and definition of an alkaloid. En *Alkaloids*. John Wiley & Sons.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open: closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 149-167. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(85\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0165-0270(85)90031-7)
- Pino, S., Prieto, S., Pérez, M. & Molina, J. (2004). Género *Erythrina*: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. *Acta Farm. Bonaerense*, 23(2), 252-258, PMID: 3797589
- Pomerleau, O. F. (1986). Nicotine as a psychoactive drug: anxiety and pain reduction. *Psychopharmacol Bull*, 22, 865-869. PMID: 3797589

- Poolton, J. M., Masters, R. S., & Maxwell, J. P. (2005). The relationship between initial errorless learning conditions and subsequent performance. *Hum Mov Sci*, 24, 362-78. <https://doi.org/10.1016/j.humov.2005.06.006>
- Prado, A. R., Quiroz, R. C., Garín, M. E., Díaz, T. A., Díaz del Guante, M. A., Galindo, L. E., Martínez, I. & Quitarte, G. L. (2004). Memoria: Consolidación y Experiencia. En *Temas Selectos de Neurociencias III*. (pp 127-136). Universidad Autónoma de México.
- Purves, D., Augustine, G., & Fitzpatrick, D. (2004). *Neuroscience*. Sunderland.
- Rageau, J. (1973). *Les Plantes Medicinales de la Nouvelle-Caledonie*. Ed. Trav & Doc de Lorstom.
- Rejón-Orantes, J C., Placer, P.D. & Roldán, G. (2011). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. *Universitas Medica*, 52(1), 78-89.
- Rivera, I. M. (1943). Algunas plantas medicinales de Izúcar de Matamoros y pueblos anexos. *Anales Instituto de Biología de la Universidad Nacional de México*, 14, 37-67.
- Rodrigues-Serrano, M. A., Natri de Luca, B., da Silva-Bolzani, V., Ávila-Santos, L., Campos-Nogueira, P. J., Nunes-de-Souza, R. L., Latif, A. & Arfan, M. (2011). Anxiolytic-like effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina suberosa*. *Quim. Nova*, 34(5), 808-811. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000500015>
- Rojas, E. (2014). *Como superar la ansiedad*. Editorial de Planeta, S. A.
- Romeo, T. J. & Bell, E. A. (1974). Distribution of amino acids and certain alkaloids in *Erythrina* species. *Lloydia*, 37(4), 543-567.
- Ruiz-López, C. X. (2012). *Efecto de los alcaloides liberados y erisopina alcaloide aislado de Erythrina americana sobre una tarea de laberinto en T Elevado* [tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México] Repositorio Institucional de la UNAM. <http://132.248.9.195/ptd2013/Presenciales/0696223/Index.html>.
- Sagrera, F. J. (1991). *Enciclopedia de medicina natural: medicinas alternativas*. Iatro editores.
- Sajc, L., Grubisic, D. & Vunjak-Novakovic, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 4, 89-99. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00035-2](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00035-2)
- Salin-Pascual, R. J., Rosas, M. M., Jimenez-Genchi, A. M., Rivera-Meza, B. L. & Delgado-Parra V. (1996). Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in non smoking patients with mayor depression. *J Clin Psychiatry*, 57, 387-389. PMID 9746444.

- Salisbury, F. B. & Ross, C. W. (1992). *Plant Physiology, Hormones and Plant Regulators: Auxins -and Gibberellins*. Wadsworth Publishing.
- Scalabrin, D. A. (1984). *Structural studies of Erythrina alkaloids* (tesis doctoral University of Wales].
- Sepúlveda, G., Porta, H. & Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 3. Disponible en <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>
- Serrano, R. M. A. Batista N.L.A, Bolzani, V. S, Santos L. D. Á, Nogueira P. J. D. C, Nunes-de-Souza R. L., Latif A, & Arfan M. (2011). Anxiolytic-like effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina suberosa*. *Química Nova*, 34(5), 808-811. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000500015>
- Sharples, G. V. S. & Wonnacott, S. (2001). Neuronal nicotinic receptors. *Tocris Reviews*, 19, 1-12. <https://resources.tocris.com/pdfs/archive/nicotinicrev.pdf>
- Sitoh Y. Y & Tien R. D. (1997). The limbic system. An overview of the anatomy and its development. *Neuroimaging Clinics of North America*, 7(1), 1-10. PMID: 9100228
- Sotelo, A., Soto, M., Lucas, B. & Giral, F. (1993). Comparative studies of the alkaloidal composition of two Mexican *Erythrina* species and nutritive value of detoxified seeds. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 41, 2340-2343. <https://doi.org/10.1021/jf00036a023>
- Soto-Hernández, M. (1989). *Chemical and structural studies of Erythrina alkaloids* [tesis doctoral, University of Wales.
- Soto-Hernandez, M., & Jackson, A. H. (1994). *Erythrina* alkaloids: isolation and characterization of alkaloids from seven *Erythrina* species. *Planta Medica*, 60(2),175-177. DOI: 10.1055 / s-2006-959445
- Sperling, A. D. (1964). *Psicología simplificada*. Compañía General de Ediciones
- Squire, R. L. (1987). *Memory: and brain*. University Press.
- Stolerman, I. P., Chander C. J., Garcha H. S. & Newton J. M. (1997). Selective antagonism of behavioural effects of nicotine by dihidro-β-erythroidine in rats. *Psychopharmacology*, 129(4), 390-397. <https://doi.org/10.1007/s002130050205>
- Stossel, S. (2014). *Ansiedad; miedo, esperanza y la búsqueda de la paz interior*. Planeta, S.A.
- Swanson, L. W., & Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 172, 49–84. <https://doi.org/10.1002/cne.901720104>
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2006). *Metabolitos secundarios y defensa vegetal*. Sinauer Associates.

- Tcheknavorian, A., Asenbavery E. & Wijesekera R. D. R. (1982). Medicinal and aromatic plants of industrial Development. United Nations industrial *Development Organization*, 6, 22-34.
- Timmann, D. (2010). The human cerebellum contributes to motor, emotional and cognitive associative learning. A review. *Cortex*, 46, 845-57, <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2009.06.009>
- Toro, C. (2021, 10 de octubre). *Neurogénesis, Plasticidad neuronal, Expresión Génica de Adultos en Ambientes Enriquecidos*. <https://www.biodanza.org/es/ibf/departamento-de-investigacion-cientifica-de-ibf/1215-neurogenesis-plasticidad-neuronal>
- Tucci, S. A., Genn, R. F., & File, S. E. (2003). Methyllycaconitine (MLA) blocks the nicotine evoked anxiogenic effect and 5-HT release in the dorsal hippocampus: possible role of alpha7 receptors. *Neuropharmacology*, 44, 367-73. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(02\)00391-X](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(02)00391-X)
- Valencia G. E. A. (2013). *Validación y actualización del uso de plantas medicinales presentes en la selva valdiviana* [tesis de licenciatura, Universidad Austral de Chile]. Repositorio Institucional de la Universidad de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcv152v/doc/fcv152v.pdf>
- Valencia O.C. (1995). *Fundamentos de Fitoquímica*. Trillas.
- Valencia, E. (2013). *Validación y actualización del uso de plantas medicinales presentes en la selva valdiviana* [tesis de licenciatura, Universidad Austral de Chile]. Repositorio Universidad Austral de Chile <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcv152v/doc/fcv152v.pdf>
- Villar Del F. A. (1999). *Farmacognosia General*. Editorial Síntesis S.A.
- Ventrichi, M. (2014). *Filogenia do gênero Erythrina L. (Leguminosae, Papilionoideae, Phaseoleae) e revisão taxonômica das espécies ocorrentes no Brasil* [tesis de doctorado, Universidade Estadual de Campinas]. Repositorio UNICAMP. <http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/314802>
- Viana, M. B., Tomaz, C. & Graeff, F. G. (1994). The Elevated T-Maze: A New Animal Model of Anxiety and Memory. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 49(3), 549-554. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(94\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0091-3057(94)90067-1)
- Vijaya, G., Chitti, N., Ravi, P., Subba, D., & Venkateswarlu, P. (2008). Potential of *Erythrina variegata orientalis* leaf powder for the removal of cobalt (II). *Chemical Engineering Communications*, 196(4), 463-480. <https://doi.org/10.1080/00986440802484002>
- Villanueva, C., Ibrahim, M. & Casasola, F. (2008). *Valor económico y ecológico de las cercas vivas en fincas y paisajes ganaderos*. CATIE.

- Willaman, J. & Bernice, G. (1961). *Alkaloids-bearing plants and their contained alkaloids*. Agricultural Research Service. U.S. Dept of Agricultural.
- Williams, M. & Robinson, J. L. (1984). Binding of the nicotinic cholinergic antagonist, dihydro- β erythroidine, to rat brain tissue. *J Neurosci*, 4, 2906-2911. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-12-02906.1984>
- Zangrossi, H. & Graeff, F. G. (1996). Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. *Brain Research Bulletin*, 44, 1-5. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(96\)00381-4](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(96)00381-4)
- Zavaleta, W., Millones, C., Torres, E. & Vásquez, E. (2010). Sustitución parcial de harina de trigo (L.) con harina y pasta de pajuro (Triana) para la elaboración de pan enriquecido. *Rev. Aporte Santiaguino*, 3(1), 1.