



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN BOTÁNICA

Estudio químico y biológico de *Erythrina coralloides* DC.

ROBERTO BRITO BATALLA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2016


La presente tesis titulada: **Estudio químico y biológico de *Erythrina coralloides* DC.** realizada por el alumno: **Roberto Brito Batalla** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
Dr. Ramón Marcos Soto Hernández

ASESOR: 
Dr. Florentino Víctor Conde Martínez

ASESOR: 
M en C. Rubén San Miguel Chávez

ASESOR: 
Dra. Penélope Aguilera Hernández

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio del 2016.

Parte del trabajo experimental fue realizado en el Instituto de Neurobiología de la UNAM, en el laboratorio de “Comunicación intercelular y neurotransmisión”, gracias al apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, DGAPA, UNAM; Programa De Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT: IN205016-2, al Dr. Jesús García Colunga).

Estudio químico y biológico de *Erythrina coralloides* DC.

Roberto Brito Batalla, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

El género *Erythrina* se encuentra distribuido en varias partes del mundo y en México se encuentra en un considerable número de especies. Ha sido utilizado por varias culturas como una planta medicinal. Existen estudios donde se muestra la actividad biológica que tienen los alcaloides contenidos en este género y su relación con los receptores nicotínicos neuronales.

El objetivo de la presente investigación fue extraer alcaloides de semillas de *E. coralloides* y evaluar su efecto sobre la actividad de receptores nicotínicos de acetilcolina de interneuronas del *stratum oriens* (so) del cuerno de amón 1 (CA1) del hipocampo de ratas Sprague-Dawley de 13 a 17 días postnatales. Las semillas se recolectaron en el año 2014 en Texcoco de Mora, Estado de México. Se colectaron ejemplares que fueron depositados en el herbario-hortorio CHAPA del Colegio de Postgraduados para su determinación taxonómica. Se utilizaron 3 kg de semillas molidas de *E. coralloides* para la extracción de los alcaloides, la cual se realizó en tres partes por medio del sistema soxhlet, y se obtuvieron tres extractos: en hexano, metanol y el resultado de una hidrólisis ácida del residuo. Los rendimientos de cada fracción fueron 13.07, 90.90 y 15.97 mg/100 g de semilla, respectivamente. Posteriormente se realizaron registros electrofisiológicos por medio de la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa, sobre interneuronas del so de CA1 que expresaban receptores nicotínicos de acetilcolina, éstas fueron estimuladas con pulsos de acetilcolina (3 mM). Este tipo de interneuronas colinérgicas juegan un papel muy importante en la regulación fisiológica del hipocampo. El extracto que mostró el efecto más notable fue en hexano, inhibió irreversible el 60% de la corriente iónica generada con acetilcolina. Este efecto antagónico es bastante alto para ser un material sin modificación por síntesis orgánica, además el hecho de que se una de manera aparentemente irreversible es una característica poco común.

Palabras clave: Alcaloides, *Erythrina coralloides*, extracto en hexano, receptores nicotínicos, *stratum oriens*.

Chemical and biological study of *Erythrina coralloides* DC.

Roberto Brito Batalla, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

The genus *Erythrina* is distributed in various parts of the world and Mexico there is a considerable number of species. It has been used by various cultures as a medicinal plant. In addition, there are studies regarding the biological activity of alkaloids contained in this genus and their relationship with neuronal nicotinic receptors.

The aim of this research was to extract alkaloids from seeds of *E. coralloides* and evaluate their effect on the activity of nicotinic acetylcholine receptors of *stratum oriens* interneurons of *cornu ammon* 1 of the hippocampus of Sprague-Dawley rats from 13 to 17 days postnatal. The seeds were collected in 2014 in Texcoco de Mora, State of Mexico. *E. coralloides* specimens were deposited in the herbarium-hortorio CHAPA of Colegio de Postgraduados for taxonomic determination were collected. Likewise, 3 kg ground seeds of *E. coralloides* for the extraction of alkaloids were used. The extraction was conducted in three parts through soxhlet system, and three extracts were obtained: hexane, methanol and the result of acid hydrolysis of the residue. The yields of each fraction were 13.07, 90.90 and 15.97 mg / 100 g seed, respectively. Subsequently electrophysiological recordings was obtained by the voltage clamp technique in the whole cell mode on interneurons *stratum oriens* expressing nicotinic acetylcholine receptors. They were stimulated with pulses of acetylcholine (3 mM). This type of cholinergic interneurons play a very important role in the physiological regulation of the hippocampus. The hexane extract was the most effective fraction. It inhibited irreversibly 60% of the ion current generated by acetylcholine. This antagonistic effect is high enough and can be considered a completely natural material without any synthetical modification. Apparently, the effect is irreversible, which is a rare feature.

Keywords: Alkaloids, *Erythrina coralloides*, hexane extract, nicotinic receptors, *stratum oriens*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo financiero para la realización de este trabajo de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, Campus Montecillos, por ser mi casa de estudios durante mi maestría.

Al Dr. Ramón Marcos Soto Hernández, por compartir sus conocimientos y apoyarme durante mi formación profesional.

Al Dr. José Jesús García Colunga, por el valioso apoyo brindado ha esta investigación.

Al consejo particular: Dra. Penélope Aguilera, M. en C. Rubén San Miguel y Dr. Víctor Conde, por su apoyo y valiosas contribuciones al escrito de esta investigación de tesis.

A todas las personas que me apoyaron y a lo largo de esta investigación, y tuve la fortuna y el placer de conocer.

DEDICATORIAS

A mis padres, Roberto Brito López (Rufís) y Merced Batalla Salvador, sin ustedes nada de esto sería posible.

A mi hermosa hija Roxana, nunca dejes de soñar y luchar, te amo.

A mis hermanos Bernard's chuster y Coyol la hobbit, me caen bien jajaja, los amo.

A mis sobrinitos Ame, Camí y Sheng Long, los amo.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. OBJETIVOS	5
IV.I. Objetivo general	5
IV.I.I. Objetivos específicos	5
V. HIPÓTESIS	6
V.I. Hipótesis general	6
V.I.I. Hipótesis específicas	6
VI. REVISIÓN DE LITERATURA	7
VI.I. Generalidades de <i>Erythrina coralloides</i> DC.	7
VI.II. Aspectos medicinales y fitoquímicos del género <i>Erythrina</i>.	8
VI.III. Alcaloides de <i>Erythrina</i>	11
VI.IV. Farmacología de <i>Erythrina</i>	14
VI.V. Generalidades del sistema nervioso	16
VI.VI. Receptores nicotínicos de acetilcolina	20
VI.VII. Hipocampo	23
VI.VIII. <i>Stratum oriens</i>	27
VI.IX. Enfermedades relacionadas con receptores nicotínicos del hipocampo	30
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	32

1.- Colecta y preparación del material biológico de <i>Erythrina coralloides</i> DC.	32
2.- Identificación taxonómica	32
3.- Extracción de alcaloides	32
4.- Identificación de alcaloides presentes en los extractos por medio del reactivo de Dragendorff.	33
5.- Cromatografía preparativa y resonancia magnética nuclear (RMN- ¹ H)	34
6.- Registro electrofisiológico por medio de la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa.	34
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
1.- Recolección de semillas de <i>E. coralloides</i>	38
2.- Extracción de alcaloides de semillas de <i>E. coralloides</i>	39
3.- Efecto de extractos de alcaloides de <i>E. coralloides</i> sobre interneuronas del <i>stratum oriens</i>	41
IX. CONCLUSIONES.....	51
X. LITERATURA CITADA.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales partes vegetales del género <i>Erythrina</i> utilizadas en la medicina tradicional, adaptado de (Araújo-Júnior et al., 2012).....	9
Figura 2. Esqueletos de los dos principales grupos de alcaloides de <i>Erythrina</i> : eritrinano (izquierda) y homoeritrinano (derecha), modificado de (Soto-Hernández et al., 2012).	12
Figura 3. Estructura de los alcaloides diénicos (izquierda) y alquenicos (derecha) (Soto-Hernández et al., 2012).	13
Figura 4. Estructura de los alcaloides lactónicos (Soto-Hernández et al., 2012).	13
Figura 6. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de diferentes subunidades nicotínicas de acetilcolina. Las secuencias de subunidades tipo β se conserva el residuo de ácido aspártico. (B) Interacción espacial entre el residuo de ácido aspártico y un alcaloide de <i>Erythrina</i> , tomada de (Iturriaga-Vasquez et al., 2010).	15
Figura 7. Izquierda: diferentes tipos de neuronas. Derecha: se observa un esquema de las diferentes partes de la neurona y los procesos que se llevan a cabo (Morris & Fillenz, 2003).	17
Figura 8. Sinapsis neuronales del sistema nervioso en las que participan neurotransmisores. ACh, acetilcolina; M, receptor muscarínico; N, receptor nicotínico; NA, noradrenalina (Constanzo, 2011).	18
Figura 9. Estructura tridimensional refinada del receptor nicotínico de Torpedo. (a) Vista frontal a la hendidura sináptica. (b) Vista lateral a la membrana celular (Unwin, 2005).....	21
Figura 10. Sitios de unión de la ACh a los receptores nicotínicos heteropentaméricos y homopentaméricos (Gotti et al., 2006).	22
Figura 11. Expresión de diferentes tipos de receptores nicotínicos en cerebro de roedores (Gotti et al., 2006).....	23
Figura 12. Esquema del hipocampo donde se observa la ubicación de sus cuatro capas más importantes: <i>stratum oriens</i> (SO), <i>stratum radiatum</i> (SR), <i>stratum pyramidale</i> (SP) y <i>stratum lacunosum moleculare</i> (SLM) (Arnáiz, 2008).	24

Figura 13. Esquema del hipocampo adulto mostrando la tradicional vía excitatoria trisináptica. Abreviaturas: corteza entorrinal (CE), giro dentado (GD), cuerno de amón (CA), subiculum (Sub), vía perforante y la vía temporoammonica (VT) (Olivares et al., 2015).....	25
Figura 14. Modalidades de memoria a largo plazo (Barrett et al., 2010).	26
Figura 15. Tipos de corrientes generadas por receptores nicotínicos en diferentes estratos del hipocampo, (Sudweeks & Yakel, 2000).	28
Figura 16. Modulación inhibitoria de las diferentes interneuronas GABAérgicas que expresan receptores nicotínicos en CA1 del hipocampo, Abreviaturas: Alveus (alv), stratum lacunoso-moleculare (s.l.m.), <i>stratum oriens</i> (s.o.), stratum piramidale (py), stratum radiatum (s.r), Fibras de la vía perforante (PPF), GABAérgica (GABA) y Glutamatérgica (Glu) (Albuquerque et al., 2009).....	29
Figura 17. Flor, vainas, semillas y árbol de <i>E. coralloides</i>	38
Figura 18. Placa cromatográfica de alcaloides libres de la fracción en hexano observados a luz ultravioleta de onda larga (1), corta (2) y a luz visible (3) con reactivo de Dragendorff.	40
Figura 19. Placa cromatográfica de alcaloides libres de la fracción en metanol observados a luz ultravioleta de larga (1), corta (2) y a luz visible (3) con reactivo de Dragendorff.	40
Figura 20. Placa cromatográfica de alcaloides liberados de la fracción obtenida por hidrólisis de la fase acuosa del extracto en metanol observados a luz ultravioleta de onda larga (1), corta (2) y a luz visible (3) con reactivo de Dragendorff.	40
Figura 21. Diferentes tipos de respuesta de interneuronas del <i>stratum oriens</i> inducidas por acetilcolina 3 mM.....	41
Figura 22. Efecto de los extractos de alcaloides de <i>E. coralloides</i> (1 mM) sobre la respuesta rápida de las interneuronas del <i>stratum oriens</i> del cuerno de amón 1. (H.s.) Hidrolizado soluble.....	43
Figura 23. Efecto antagónico reversible del extracto de alcaloides hidrolizados solubles en metanol (1 mM) sobre la respuesta rápida de interneuronas del <i>stratum oriens</i>	44

Figura 24. Efecto antagónico irreversible del extracto en hexano de <i>E. coralloides</i> . (1 mM) en la respuesta nicotínica lenta de las interneuronas del <i>stratum oriens</i>	46
Figura 25. Promedio del efecto del extracto en hexano de <i>E. coralloides</i> (1 mM) en la respuesta nicotínica lenta de las interneuronas del <i>stratum oriens</i> (n = 6).	46
Figura 26. Imagen representativa de la potenciación de la actividad sináptica de la interneurona del <i>stratum oriens</i> del cuerno de Amón 1 en presencia de dihidro β eritroidina, el extracto en hexano y acetilcolina. Los siguientes tratamientos se aplicaron a una misma neurona: 1. Se aplicó ACh 3 mM; 2. Se aplicó el extracto en hexano 1 mM, seguido de lavado durante 1 hora; 3) Se aplicó ACh 3 mM; 4) Se aplicó el inhibidor DH β E 500 nM (Sigma - Aldrich), seguido de lavado durante 15 minutos; y 5) Se agregó ACh 3 mM.	47
Figura 27. Sobreexpresión de la subunidad α 2 en el <i>stratum oriens</i> del cuerno de Amón 1 en ratas de diferentes edades a partir del día posnatal (P) 1 y hasta el día posnatal 21, AD hace referencia a ratas adultas. Modificada de (Son & Winzer-Serhan, 2006).	48
Figura 28. Porcentaje de expresión de las diferentes subunidades en las interneuronas de las diferentes capas del cuerno de Amón 1. Modificado de (Son & Winzer-Serhan, 2008).	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Frecuencia de presentación de los principales metabolitos secundarios en órganos de especies de <i>Erythrina</i> , tomada de (Pino-Rodriguez et al., 2004).	9
Tabla 2. Diferentes tipos de neurotransmisores (Constanzo, 2011).....	19
Tabla 3. Rendimiento de los extractos por cada 100 gramos de semillas.....	39
Tabla 4. Respuesta de interneuronas del <i>stratum oriens</i> del Cuerno de Amón 1 del hipocampo ante la estimulación con ACh.....	42

I. INTRODUCCIÓN

El ser humano ha evolucionado junto con las plantas, e incluso es posible que los homínidos que precedieron al hombre hayan hecho uso de las plantas medicinales que los rodeaban. De hecho se ha documentado que los animales utilizan plantas medicinales para aliviar sus diversas patologías (Biser, 1998). Las antiguas civilizaciones usaron las plantas medicinales para mejorar sus condiciones de vida, lo que aumentaba sus posibilidades de supervivencia (Araújo-Júnior, Oliveira, Aquino, Alexandre-Moreira, & Ana, 2012).

En 1978, la organización mundial de la salud (OMS) reconoció los beneficios de la medicina tradicional. Durante la conferencia *Alma ata* publicada en 1985 se dió a conocer que más de 80 % de la población mundial hace uso de la medicina tradicional ahora llamada fitoterapia como su primer tratamiento médico. Una de las estrategias de la OMS para la medicina tradicional en el periodo 2002-2005 fue la de fortalecer los remedios tradicionales colocándolos en los Sistemas Nacionales de Salud a través de políticas de los respectivos gobiernos (Araújo-Júnior et al., 2012).

Los compuestos producidos por las plantas que tienen efectos medicinales son producto de su metabolismo secundario. Algunos de estos compuestos con efectos farmacobiológicos son: flavonoides, saponinas, taninos, terpenos y alcaloides (Ávalos & Pérez-Urria, 2009; San Miguel-Chavez, Soto-Hernandez, Terrazas, & Kite, 2006).

Existe un género de especies de la familia Fabaceae rico en metabolitos secundarios principalmente en compuestos de tipo alcaloide. Este es el género *Erythrina*, que está distribuido en varias partes del mundo y ha sido utilizado en varias culturas como una planta medicinal (Pino-Rodríguez, Prieto-González, Pérez-Rodríguez, & Molina-Torres, 2004). Se ha reportado su uso como: antimalaria, anti-VIH, citotóxico, sedante, anticonvulsivo, antiinflamatorio, entre muchos otros (Hastings, 1990; Martinez Alfaro, 1984; Mohammed et al., 2012).

Entre los diferentes usos que se le atribuyen a los compuestos presentes en el género *Erythrina* destaca el efecto que tiene sobre el sistema nervioso. Entre estos, los alcaloides del género *Erythrina* actúan sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina del sistema nervioso central y periférico (Soto-Hernández et al., 2012).

En México se encuentran distribuidas un gran número de especies de *Erythrina*, varias de estas endémicas, por tal motivo surgió el interés en realizar un estudio sobre estas especies, en particular sobre *E. coralloides* una especie nativa de nuestro país que se encuentra amenazada según la última actualización realizada en el año 2010 de la Norma Oficial Mexicana 059 (SEMARNAT, 2010).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los alcaloides destacan entre los compuestos que a bajas concentraciones tienen potentes efectos sobre el sistema nervioso. La especie *E. coralloides* pertenece a un grupo de plantas ricas en compuestos de tipo alcaloide que tienen un potencial farmacológico y que se pueden utilizar para aliviar enfermedades del sistema nervioso. Por lo tanto, quisimos determinar si los alcaloides de *E. coralloides* se podrían utilizar como fármacos con un efecto sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina.

III. JUSTIFICACIÓN

La búsqueda de nuevas estructuras químicas presentes en extractos de plantas medicinales con efectos farmacológicos es una de las misiones de los investigadores contemporáneos. Estos compuestos que podemos encontrar en las plantas tienen la capacidad y el potencial para aliviar las diversas enfermedades que agobian a la población mundial, en particular a la población de escasos recursos. La Organización Mundial de la Salud pretende fortalecer el uso de las plantas medicinales en las diferentes partes del mundo, con el fin de elevar la calidad de vida de la población. Sin embargo, no es una tarea fácil, existen muchos tabúes negativos relacionados con el uso de este tipo de terapias, las cuales aún persisten entre la sociedad. Cabe mencionar que el uso de este tipo de terapias naturales no se debe tomar a la ligera, ya que muchos de los compuestos que contienen las plantas medicinales, como es el caso de los alcaloides, pueden ser tóxicos.

IV. OBJETIVOS

IV.I. Objetivo general

Extraer alcaloides de semillas de *E. coralloides* y evaluar su efecto sobre la actividad de los receptores nicotínicos presentes en interneuronas del hipocampo de rata.

IV.I.I. Objetivos específicos

- Extraer y cuantificar los alcaloides libres y liberados de semillas de *E. coralloides*.
- Estudiar el efecto del extracto en hexano sobre las interneuronas del *stratum oriens* del cuerno de amón 1 de rata Sprague Dawley (SD).
- Estudiar el efecto del extracto en metanol sobre las interneuronas del *stratum oriens* de rata SD.
- Estudiar el efecto del extracto de alcaloides hidrolizados solubles en diclorometano sobre las interneuronas del *stratum oriens* de rata SD.
- Estudiar el efecto del extracto de alcaloides hidrolizados solubles en metanol sobre las interneuronas del *stratum oriens* de rata SD.

V. HIPÓTESIS

V.I. Hipótesis general

Los alcaloides extraídos de las semillas de *E. coralloides* mostrarán actividad biológica.

V.I.I. Hipótesis específicas

- Las semillas de *E. coralloides* tendrán contenido de alcaloides.
- El extracto en hexano tendrá efecto antagónico sobre las interneuronas del *stratum oriens* de rata SD.
- El extracto en metanol tendrá efecto antagónico sobre las interneuronas del *stratum oriens* de rata SD.
- El extracto de alcaloides hidrolizados solubles en diclorometano tendrá efecto antagónico sobre las interneuronas del *stratum oriens* de rata SD.
- El extracto de alcaloides hidrolizados solubles en metanol tendrá efecto antagónico sobre las interneuronas del *stratum oriens* de rata SD.

VI. REVISIÓN DE LITERATURA

VI.I. Generalidades de *Erythrina coralloides* DC.

Podemos encontrar a las especies vegetales del género *Erythrina* como árboles, hierbas y arbustos. Pertenecen a la familia Fabaceae (Leguminosas), subfamilia Papilionoidae la cual se encuentra dividida en 5 subgéneros (MacVaugh, 1987). Se han descrito para este género 115 especies, comprendiendo una gran diversidad de variaciones morfológicas y ecológicas. Las especies de *Erythrina* se encuentran distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. En cuanto a la descripción botánica del género *Erythrina* está representado por hierbas, arbustos y árboles perennes con un largo tallo, subterráneo y leñoso. Estas especies son características por tener hojas alternadas con tres hojas pequeñas, muchas tienen púas cónicas sobre la corteza del tronco y las ramas (García-Mateos, Soto-Hernández, & Vibrans, 2001).

Hablando específicamente sobre las características de *E. coralloides*, Rzedowski describe la especie como árboles o arbustos armados de espinas; hojas con peciolo densamente pubescente, aculeado, raquis pubescente, folíolos laterales ovado-deltaideos, folíolo terminal anchamente ovado-deltaideo o semiorbicular, por lo general más ancho que largo, ápice agudo, margen entero, base truncada, haz glabro, envés pubescente o glabro; flores con brácteas más largas que anchas, pedicelo pubescente; cáliz campanulado, pubescente, con cinco dientes; corola con el estandarte rojo, angostamente elíptico, ápice agudo o redondeado; ovario café, pubescente; legumbre oscura, leñosa, constreñida entre las semillas, largamente estipitada; semillas reniformes y rojas (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2005).

La distribución ecológica del género *Erythrina* incluye una amplia diversidad de condiciones ambientales. En México se distribuye principalmente en las regiones del sur (Sánchez, 2000). La especie *E. coralloides* se encuentra distribuida en varias ciudades del país, ya que la utilizan como árbol ornamental en parques y

calles. Se pueden encontrar desde el centro hasta el sureste del país, principalmente en los estados Veracruz, Estado de México, Puebla, Hidalgo, Guerrero, Morelos y Oaxaca (MacVaugh, 1987). Las zonas donde se distribuye esta especie generalmente tienen climas cálidos húmedos, cálidos subhúmedos, semicálidos subhúmedos hasta los climas secos (García-Mateos et al., 2001).

VI.II. Aspectos medicinales y fitoquímicos del género *Erythrina*.

El interés en el estudio de plantas que presentan actividad medicinal se ha generado a lo largo del tiempo. Durante cientos de años las plantas medicinales fueron el principal recurso terapéutico disponible para curar las enfermedades. En la medicina moderna la cuarta parte de las sustancias son de origen vegetal, el porcentaje restante proviene de la industria sintética. Sin embargo, actualmente se ha despertado nuevamente el interés en la búsqueda de nuevos fármacos provenientes de plantas con efectos farmacológicos (Araújo-Júnior et al., 2012).

Las especies del género *Erythrina* son usadas como plantas medicinales en varias partes del mundo, debido a la actividad biológica asociada a su alta concentración de metabolitos secundarios. Algunos estudios etnobotánicos muestran el uso tradicional como medicamento de estas plantas. A continuación se muestran los países que destacan por el uso en la medicina tradicional de estas especies vegetales: México (21%), India (20%), Perú (6%), Indonesia (4%), Papúa-Nueva-Guinea (3%), Kenya (3%), Argentina (3%), Brasil (3%), Tanzania (3%), Tailandia (3%), Rotuma (3%), Rwanda (3%) y Senegal (3%). Las especies reportadas con mayor frecuencia son *Erythrina variegata* L. (19%), *E. abyssinica* (10%), *E. indica* Lam (8%), *E. fusca* Lour (8%) y *E. senegalensis* DC. (7%). Cabe mencionar que la especie más estudiada no es endémica de México. Los datos presentados anteriormente se basan en la información recopilada de las bases de datos de NAPRALERT, Chemical Abstracts y MEDLINE publicadas hasta el año 2002 (Pino-Rodríguez et al., 2004).

En la siguiente gráfica tomada de la revisión de Araújo y colaboradores en 2012 podemos observar las partes de la planta que se usan principalmente en la medicina tradicional en diferentes partes del mundo.

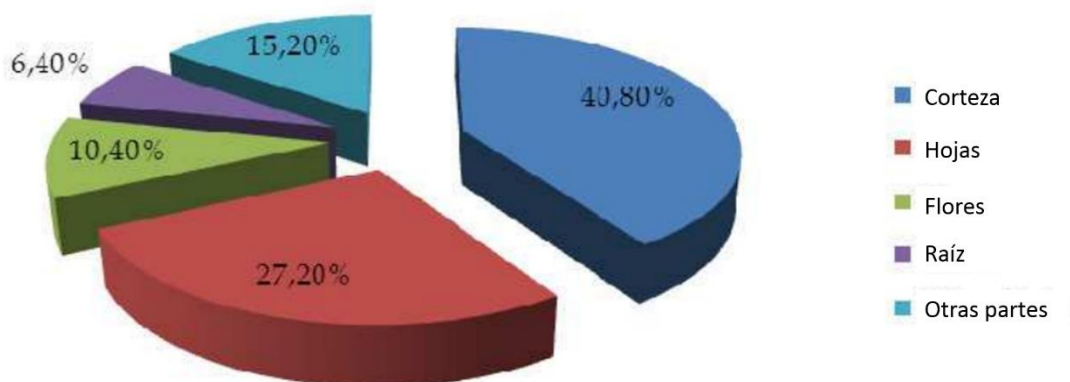


Figura 1. Principales partes vegetales del género *Erythrina* utilizadas en la medicina tradicional, adaptado de (Araújo-Júnior et al., 2012).

Las familias químicas que se reportan con mayor frecuencia son los alcaloides (38%), flavonoides (38%) y los proteoides (9%). Dentro de esta última familia se encuentran los aminoácidos, proteínas y las lectinas. Para un total de 82 reportes de proteoides, las lectinas representan el 39% (Pino *et al.*, 2004). La siguiente tabla muestra los metabolitos reportados de diferentes estudios en diferentes partes del género *Erythrina*.

Tabla 1. Frecuencia de presentación de los principales metabolitos secundarios en órganos de especies de *Erythrina*, tomada de (Pino-Rodríguez et al., 2004).

Familia Química	Frecuencia de presentación (%)						
	Semillas	Corteza Tallo	Corteza	Flores	Raíz corteza	Raíz	Hojas
flavonoides	-	70	28	42	-	96	27
alcaloides	76	2	26	43	-	-	64
esteroides	1	9	15	6	-	-	-
lípidos	1	-	12	5	-	-	-
alcano	-	-	7	-	-	-	-
alcano	-	-	5	-	-	-	-
triterpenoides	-	12	3	2	-	-	9
fenilpropanoides	-	6	2	2	4	-	-
coumarinas	-	-	1	-	8	-	-
compuestos inorgánicos	-	-	1	-	-	-	-
proteoides	22	1	-	-	-	2	-
bencenoides	-	-	-	-	-	2	-

A continuación se citan ejemplos de artículos científicos donde se describen diferentes usos de estas especies: actividad antibacteriana (Bunalema et al., 2012; Souza et al., 2014), efecto citotóxico en leucemia (Omosa et al., 2016), efecto antiinflamatorio en enfermedades parasitarias (Nasimolo, Kiama, Gathumbi, Makanya, & Kagira, 2014), uso como fitoestrógenos en desordenes hormonales (Djiogue et al., 2014), como insecticida contra vectores de malaria, filarías y dengue (Govindarajan & Sivakumar, 2014), efecto antiviral (Omwenga, Hensel, Shitandi, & Goycoolea, 2015), problemas de fertilidad, anticonvulsivo (Tugume et al., 2016; Vasconcelos et al., 2007), sedante (Dantas et al., 2004), desordenes de ansiedad (Sarris, McIntyre, & Camfield, 2013) y en la enfermedad de Alzheimer (Shakir, Coulibaly, & Kehoe, 2013). Esto es solo una pequeña muestra el potencial medicinal de los compuestos sintetizados por estas especies y el aprovechamiento que se puede generar de estos, ya sea en la medicina convencional o en la medicina tradicional.

Se han reportado la presencia de los siguientes metabolitos secundarios en las especies de *Erythrina*: flavonoides, isoflavonoides, antocianinas, lectinas, pterocarpanos y alcaloides (Soto-Hernández et al., 2012). La amplia gama de estos metabolitos secundarios les confiere la capacidad de generar efectos farmacobiológicos de interés clínico, tales como actividad antiviral, antibacteriana, antiinflamatoria, antitumoral, desórdenes neurológicos, entre otros. Estos son parte importante para mejorar los problemas de salud a nivel mundial (Araújo-Júnior et al., 2012).

El interés farmacológico en *Erythrina* se remonta a finales del siglo diecinueve. Las investigaciones para la extracción e identificación de los compuestos de estas especies surgieron a raíz de su efecto biológico similar al del curare. Dicho efecto es generado por los alcaloides que son sintetizados por estas especies. Estos actúan a nivel del sistema nervioso, ya que antagonizan los receptores nicotínicos de acetilcolina que regulan las actividades neuromusculares (Soto-Hernández et al., 2012).

VI.III. Alcaloides de *Erythrina*

Las plantas que son capaces de sintetizar alcaloides constituyen un grupo muy variado tanto taxonómica como químicamente, por lo tanto existe una amplia variedad de familias de alcaloides sintetizados por las plantas con una amplia diversidad de estructuras químicas. Al parecer el único factor que unifica esta amplia diversidad de especies vegetales y estructuras químicas es el hecho que contienen un nitrógeno básico en la molécula. Generalmente este tipo de compuestos son muy tóxicos para los organismos que se encuentran expuestos aún a bajas concentraciones de estos. Un factor importante que les confiere esta toxicidad a concentraciones tan pequeñas es su capacidad de unirse con alta afinidad a los receptores del sistema nervioso (Evans, 2009).

Los alcaloides del género *Erythrina* han mostrado efectos antagónicos sobre receptores nicotínicos de acetilcolina (Daly, 2005). Es por esto que los investigadores han mostrado interés en las estructuras químicas sintetizadas por este género.

Altamirano (1888) y Greshoff (1890) fueron los primeros que obtuvieron un compuesto brillante y cristalino de semillas de estas especies. Este último aisló varios compuestos inespecíficos y debido a su notable actividad biológica sugirió un estudio fitoquímico a las especies de este género. Sin embargo tuvo que pasar medio siglo para que esto empezara a llevarse a cabo. Folkers a mediados de la década de 1930 demostró que más de 50 especies *Erythrina* tenían un efecto similar al curare. Además, junto con su equipo de trabajo fueron capaces de aislar el primer compuesto eritriano, el cual llamaron eritroidina. En años posteriores fueron aislados otras estructuras provenientes de estas especies, tales como: eritramina, eritralina, eritratina (1940), erisodina, erisopina y erisovina (1951) (Soto-Hernández et al., 2012).

Farmacológicamente los alcaloides de *Erythrina* son curarizantes, muy tóxicos. Su ingestión produce parálisis del músculo liso, a diferencia del curare que actúa por vía intravenosa. Los alcaloides de *Erythrina* pueden ser extraídos de los

órganos de la planta con agua, ya que se encuentran como ésteres sulfoacéticos o como glucósidos. Están caracterizados por tener un esqueleto base que es una espiroamina tetracíclica. Se pueden clasificar en dos grupos principales: un grupo posee un esqueleto 6, 5, 6, 6 indolisquinolina (Fig.2, izquierda) los cuales reciben el nombre de eritranos, mientras que el segundo grupo contiene un esqueleto 6, 5, 7-6 indolobenzozepina (Fig. 2, derecha) y son llamados alcaloides homoeitranos (Soto-Hernández et al., 2012).

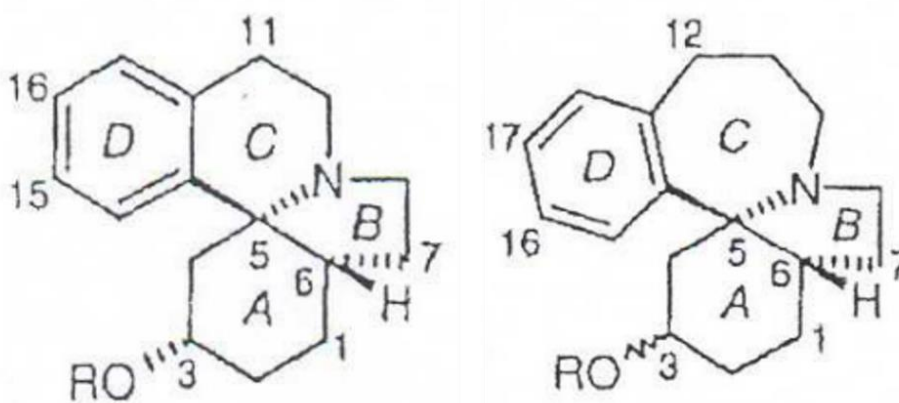


Figura 2. Esqueletos de los dos principales grupos de alcaloides de *Erythrina*: eritranos (izquierda) y homoeitranos (derecha), modificado de (Soto-Hernández et al., 2012).

Dependiendo de la naturaleza del anillo D en ambos esqueletos se pueden clasificar como aromáticos o como no aromáticos. Si en el anillo D encontramos una sustitución por un grupo funcional oxa, recibirá el nombre de alcaloides lactónicos (Soto-Hernández et al., 2012).

Los alcaloides se pueden clasificar en tres grupos a partir de las singularidades que presenta su esqueleto base: diénicos, alquénicos y lactónicos.

Los alcaloides diénicos contienen en su estructura base un sistema dieno conjugado en los anillos A y B como podemos observar en la figura 3 de lado izquierdo, mientras que los alcaloides alquénicos contienen en su estructura una insaturación 1,6 en el anillo A como podemos observar en la Figura 3 de lado derecho.

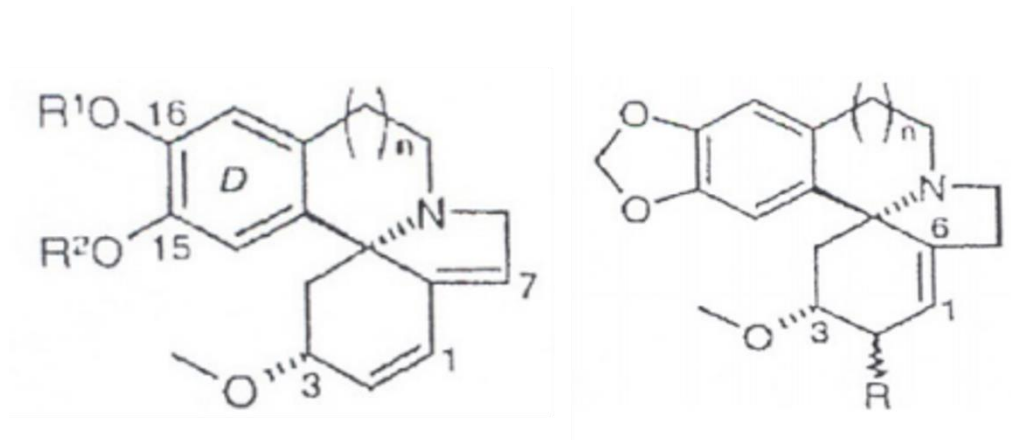


Figura 3. Estructura de los alcaloides diénicos (izquierda) y alquénicos (derecha) (Soto-Hernández et al., 2012).

Los alcaloides lactónicos contienen en su estructura una lactona insaturada en lugar del anillo aromático D (Figura 4).

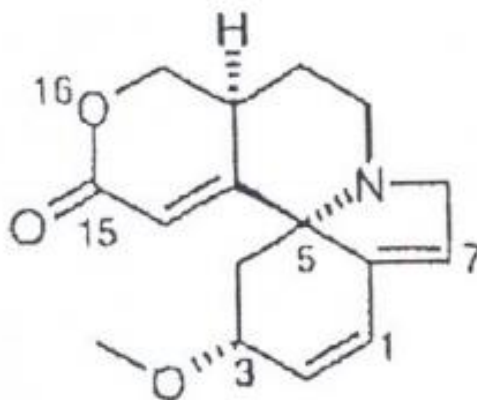


Figura 4. Estructura de los alcaloides lactónicos (Soto-Hernández et al., 2012).

VI.IV. Farmacología de *Erythrina*

Como se mencionó anteriormente la actividad farmacológica de las especies de *Erythrina* se conoce desde hace mucho tiempo. Los nativos de Sudamérica usaban extractos concentrados de estas especies, como antídoto contra estrocnina, o como hipotónico y antiepiléptico. Al primer compuesto alcaloide eritranano aislado por Altamirano en 1888, le dió el nombre de eritroidina. En estudios subsecuentes realizados a este cristal revelaron que estaba compuesto por una mezcla de dos alcaloides, estos fueron llamados α - y β - eritroidina. Posteriormente fueron aislados otros compuestos como, eritramina, eritralina, eritratina, erisodina, erisopina y erisovina (Soto-Hernández et al., 2012).

Se han realizado varios estudios sobre los alcaloides derivados de las especies de *Erythrina* sobre su efecto sobre el sistema nervioso. Existe un número limitado de potentes antagonistas nicotínicos competitivos, dentro de los cuales se encuentran los alcaloides aislados de este género, tales como: β - eritroidina, erisodina y eritralina. Estos alcaloides poseen una alta afinidad por el receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) conformado por las subunidades $\alpha 4\beta 2$ (Daly, 2005). A partir de extractos crudos de *E. americana*, se purificó β - eritroidina y se sintetizó dihidro β - eritroidina. Estos extractos se administraron a ratas agresivas y se observó un efecto tranquilizador similar al generado por el diazepam. Estos efectos se atribuyeron a la acción antagonista sobre los receptores nicotínicos de acetilcolina (Soto et al., 2011).

Iturriaga y colaboradores en 2010 estudiaron la interacción molecular que existe entre los antagonistas provenientes de *Erythrina* y el nAChR $\alpha 4\beta 2$, y llegaron a la conclusión que el residuo de ácido aspártico en la posición 196 de la subunidad $\beta 2$ es el principal determinante para la unión de los alcaloides de *Erythrina* (Iturriaga-Vasquez et al., 2010).

En la siguiente figura podemos observar en la parte A el empalme de diferentes secuencias de aminoácidos de distintas subunidades y como es que en las tipo β se conserva el residuo de ácido aspártico. En la parte B de la figura se muestra

la interacción espacial entre el ácido aspártico y un alcaloide con esqueleto eritriano.

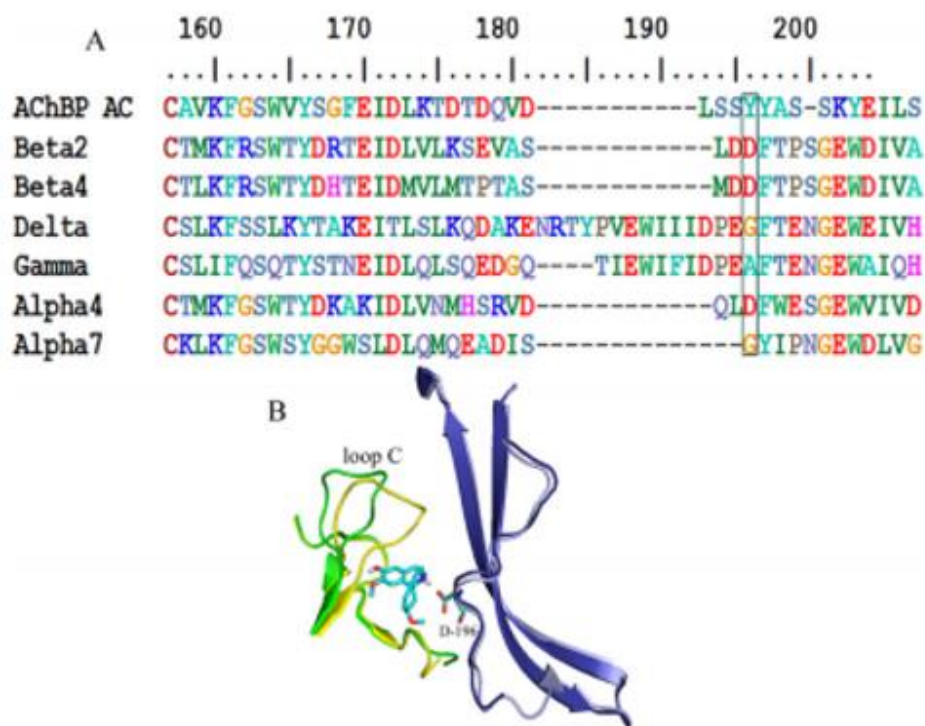


Figura 5. Alineamiento de secuencia de aminoácidos de diferentes subunidades nicotínicas de acetilcolina. Las secuencias de subunidades tipo β se conserva el residuo de ácido aspártico. (B) Interacción espacial entre el residuo de ácido aspártico y un alcaloide de *Erythrina*, tomada de (Iturriaga-Vasquez et al., 2010).

Múltiples estudios científicos sugieren el uso plantas que tienen efecto sobre el sistema nervioso central para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Pérez-Hernández, Zaldívar-Machorro, Villanueva-Porras, Vega-Ávila, & Chavarría, 2016). Por tal motivo los alcaloides sintetizados por estas especies son candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos ya sea a partir de su extracción o por síntesis orgánica (Monaco, Aliev, & Hilton, 2015).

VI.V. Generalidades del sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) es una red compleja que permite al organismo comunicarse con el medio en el que vive. Los componentes que integran el SN reciben, almacenan y procesan la información sensorial, y después coordinan las respuestas apropiadas. El SN consta del sistema nervioso central (SNC), que incluye el encéfalo y la médula espinal, y del sistema nervioso periférico (SNP), que incluye receptores sensoriales, nervios sensoriales y ganglios situados en el exterior del SNC. Ambos sistemas están muy relacionados entre sí para poder llevar a cabo los procesos tan complejos y especializados que es capaz de realizar el SN de los organismos (Constanzo, 2011).

Las partes principales del SNC son la médula espinal, el tronco del encéfalo (bulbo, protuberancia y mesencéfalo), el cerebelo, el diencefalo (tálamo e hipotálamo) y los hemisferios cerebrales (corteza cerebral, sustancia blanca, ganglios basales, hipocampo y amígdala) (Constanzo, 2011).

Las células especializadas que llevan a cabo el funcionamiento del sistema nervioso se llaman neuronas, que son los componentes fundamentales los cuales se conectan por medio de sinapsis química o eléctrica entre sí formando complejas redes. Estas redes tienen una actividad electroquímica constante con el fin de poder regular el funcionamiento correcto del organismo. Existen tres tipos fundamentales de neuronas: sensoriales, motoras e interneuronas. Las neuronas de manera general están constituidas por un cuerpo celular o soma, axón, dendritas y terminal sináptica. Existen otro tipo de células que participan de forma activa e importante en los procesos cerebrales diferentes a las neuronas, éstas reciben el nombre de células gliales. Por mucho tiempo estos cuerpos celulares se consideraron de soporte, sin embargo se ha determinado que éstos juegan un papel muy importante en el desarrollo del SN y en su funcionamiento, éstos superan en número a las neuronas, no obstante su capacidad de transmitir información no se compara con la de las neuronas. En la siguiente imagen sobre el lado izquierdo se pueden apreciar algunos ejemplos de las diferentes formas neuronales: una neurona motora espinal, una neurona piramidal y una célula de

Purkinje del cerebelo, mientras que del lado derecho podemos observar la disposición esquemática de las partes de una neurona, así como el procesamiento y la dirección de su señalización: recepción, integración y transmisión (Morris & Fillenz, 2003).

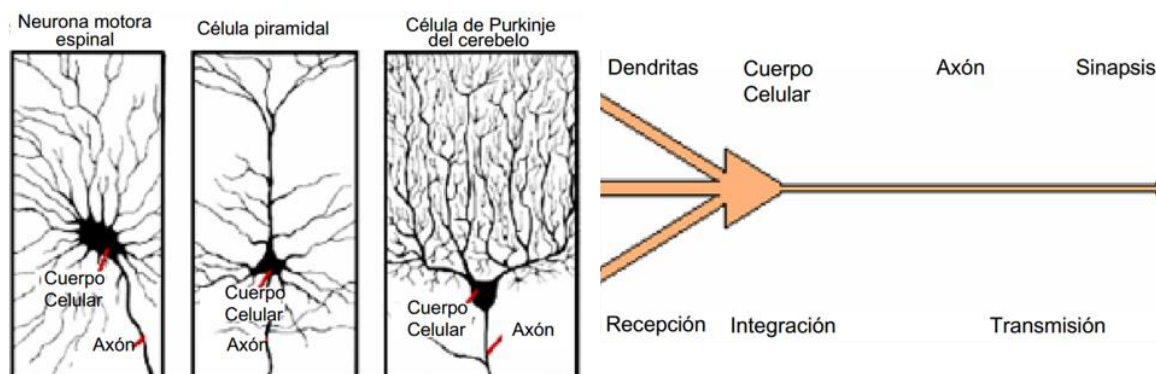


Figura 6. Izquierda: diferentes tipos de neuronas. Derecha: se observa un esquema de las diferentes partes de la neurona y los procesos que se llevan a cabo (Morris & Fillenz, 2003).

Anteriormente, se mencionó que las neuronas se comunican por medio de sinapsis químicas y/o eléctricas. La palabra sinapsis simplemente hace referencia al espacio que conecta a dos o más neuronas para poder transmitir información. Las sinapsis eléctricas permiten el flujo de corriente de una célula excitable a la siguiente, a través de vías de baja resistencia entre las células llamadas uniones comunicantes. Las uniones comunicantes se encuentran en el músculo cardíaco y en algunos tipos de músculo liso, y explican la gran rapidez de conducción en estos tejidos y su activación celular simultánea y coordinada. En las sinapsis químicas, existe un espacio de aproximadamente 20 a 30 nm entre la membrana celular presináptica y la membrana celular postsináptica conocido como hendidura sináptica. La señalización se transmite a través de la hendidura sináptica por medio de un neurotransmisor, una sustancia que se libera en el terminal presináptico y que se une a los receptores del terminal postsináptico. En las sinapsis químicas se produce la siguiente secuencia de acontecimientos: un potencial de acción en la célula presináptica provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. La entrada de Ca^{2+} en el terminal presináptico produce la liberación del neurotransmisor almacenado en las vesículas sinápticas mediante exocitosis. El neurotransmisor se difunde a

través de la hendidura sináptica, se une a los receptores en la membrana postsináptica abre los canales que permiten el paso de iones y produce un cambio en el potencial de membrana en la célula postsináptica. El cambio en el potencial de membrana en la membrana celular postsináptica puede ser excitador o inhibitor, según la naturaleza del neurotransmisor liberado en el terminal nervioso presináptico y los iones que fluyan a través de la membrana. Si el neurotransmisor es excitador, provoca la despolarización de la célula postsináptica; si es inhibitor, produce la hiperpolarización. A diferencia de las sinapsis eléctricas, la neurotransmisión a través de las sinapsis químicas es unidireccional (de la célula presináptica a la célula postsináptica). El retraso sináptico es el tiempo necesario para que tengan lugar los múltiples pasos de la neurotransmisión química. En la siguiente imagen podemos observar de manera general algunas de las uniones del SNC moduladas por algunos neurotransmisores y sus receptores (Barrett, Barman, Boitano, & Brooks, 2010; Constanzo, 2011).

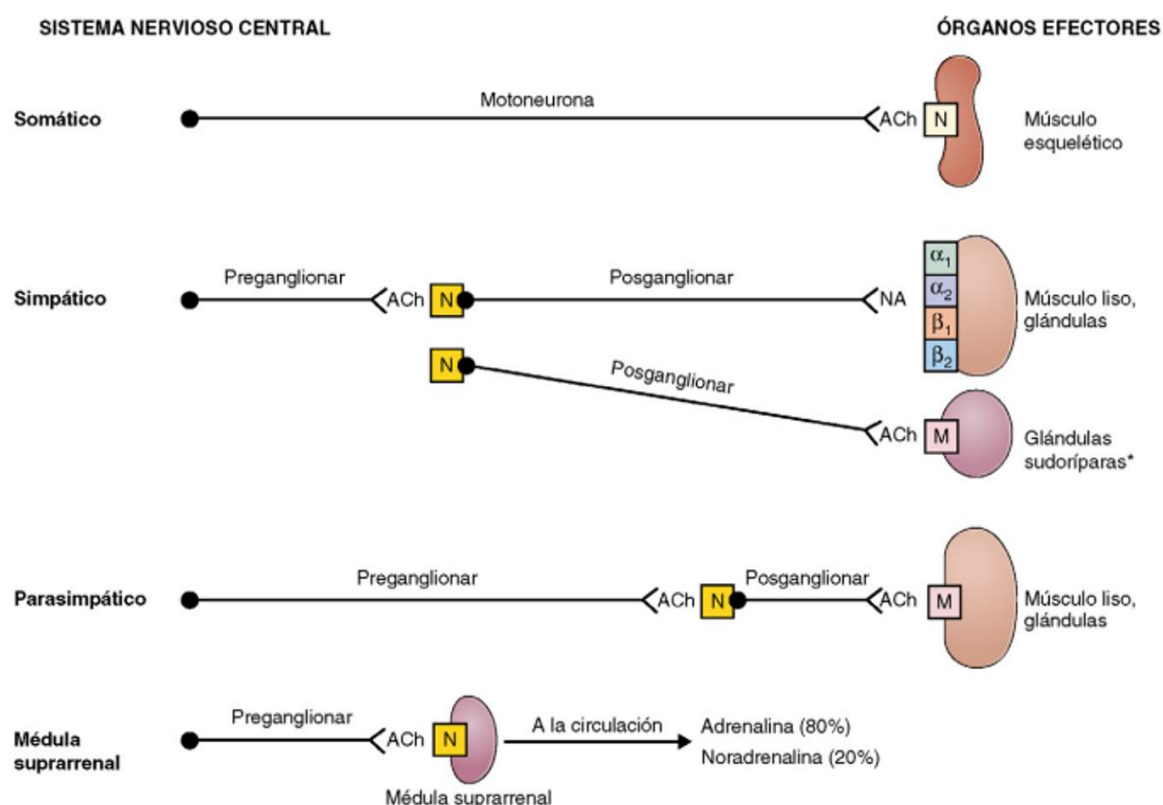


Figura 7. Sinapsis neuronales del sistema nervioso en las que participan neurotransmisores. ACh, acetilcolina; M, receptor muscarínico; N, receptor nicotínico; NA, noradrenalina (Constanzo, 2011).

Se conocen más de 50 sustancias que actúan como neurotransmisores. Los neurotransmisores pueden agruparse en las siguientes categorías: acetilcolina, aminas biogénicas, aminoácidos y neuropéptidos. Cabe mencionar que ahora se acepta el papel neurotransmisor de sustancias gaseosas como el óxido nítrico (NO) y monóxido de carbono (CO). En la tabla 2 se muestran los principales neurotransmisores (Constanzo, 2011; Luján, 2004).

Tabla 2. Diferentes tipos de neurotransmisores (Constanzo, 2011).

Ésteres de colina	Aminas biogénicas	Aminoácidos	Neuropéptidos
Acetilcolina (ACh)	Adrenalina Dopamina Histamina Noradrenalina Serotonina	Ácido γ -aminobutírico (GABA) Glutamato Glicina	Adrenocorticotropa (ACTH) Colecistocinina Dinorfina Endorfinas Encefalinas Glucagón Hormona liberadora de tirotropina (TRH) Neurotensina Oxitocina Péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) Péptido intestinal vasoactivo (VIP) Secretina Sustancia P Vasopresina

Los neurotransmisores se unen a proteínas transmembranales que son llamados receptores. Estos se pueden dividir en dos diferentes tipos: receptores ionotrópicos y receptores metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos permiten el paso de iones a través de un canal que se abre en presencia de un neurotransmisor, esta respuesta es bastante rápida, del orden de milisegundos. Por otra parte los receptores metabotrópicos muestran una respuesta más lenta, estos receptores se encuentran unidos a proteínas G, las cuales van a generar cascadas de señalización dentro de la neurona, dando lugar a la activación de segundos mensajeros y activación de otras enzimas (Luján, 2004).

En el siguiente capítulo profundizaremos sobre la importancia, estructura y funciones de los receptores nicotínicos, que se encuentran ampliamente distribuidos en el sistema nervioso (Manickavasagam Alkondon & Albuquerque, 2004).

VI.VI. Receptores nicotínicos de acetilcolina

Existe una importante super familia de receptores con bucles de cisteína que son receptores ionotrópicos, estos comprenden una clase heterogénea de canales catiónicos y aniónicos. Dentro de esta gran familia se encuentran los receptores nicotínicos de acetilcolina, que son proteínas pentaméricas intermembranales. Dichos canales se pueden clasificar en dos grupos, homoméricos o heteroméricos dependiendo de las combinaciones de subunidades de tipo alfa ($\alpha 2 - \alpha 10$) y beta ($\beta 2 - \beta 4$) por las cuales están conformados (Albuquerque, Pereira, Alkondon, & Rogers, 2009). Si se trata de un canal constituido por una sola subunidad se denomina homomérico, pero si en su estructura difiere en alguna será heteromérico. De acuerdo a las subunidades de las que esté conformado el canal recibirá el nombre, por ejemplo: receptor nicotínico $\alpha 7$ o receptor nicotínico $\alpha 4 - \beta 2$. Los receptores $\alpha 1$ y $\beta 1$ que no se mencionan anteriormente, se encuentran conformando el receptor del músculo esquelético ($\alpha 1, \beta 1, \gamma$ y δ) (Arnáiz, 2008).

Estos receptores se encuentran distribuidos ampliamente en el cuerpo, tanto en el sistema nervioso como en tejidos que no son de tipo neuronal, estos son estimulados por el neurotransmisor endógeno acetilcolina y por agonistas exógenos como la nicotina (Manickavasagom Alkondon & Albuquerque, 2004). De acuerdo con los estudios de unión a receptores nicotínicos en el cerebro, se han detectado dos subtipos: Los receptores que son sensibles a α -bungarotoxina y los que son insensibles a este compuesto. Los receptores sensibles a esta toxina son los receptores homopentaméricos receptores nicotínicos $\alpha 7, \alpha 8$ y $\alpha 9$. Mientras que los insensibles a esta toxina son los receptores heteropentaméricos, conformados por las subunidades α ($\alpha 2 - \alpha 6$) y β ($\beta 2 - \beta 4$) (Gotti, Zoli, & Clementi, 2006).

Recientemente se han realizado estudios para descubrir los diferentes sitios de unión de los receptores nicotínicos, las investigaciones de determinación estructural y cristalización de proteínas hidrosolubles provenientes de caracoles como *Lymnaea stagnalis* (Brejc et al., 2001), moluscos de agua salada como

Aplysia californica (Hansen et al., 2005) y mantarayas como *Torpedo marmorata* (Unwin, 2005) (Figura 8).

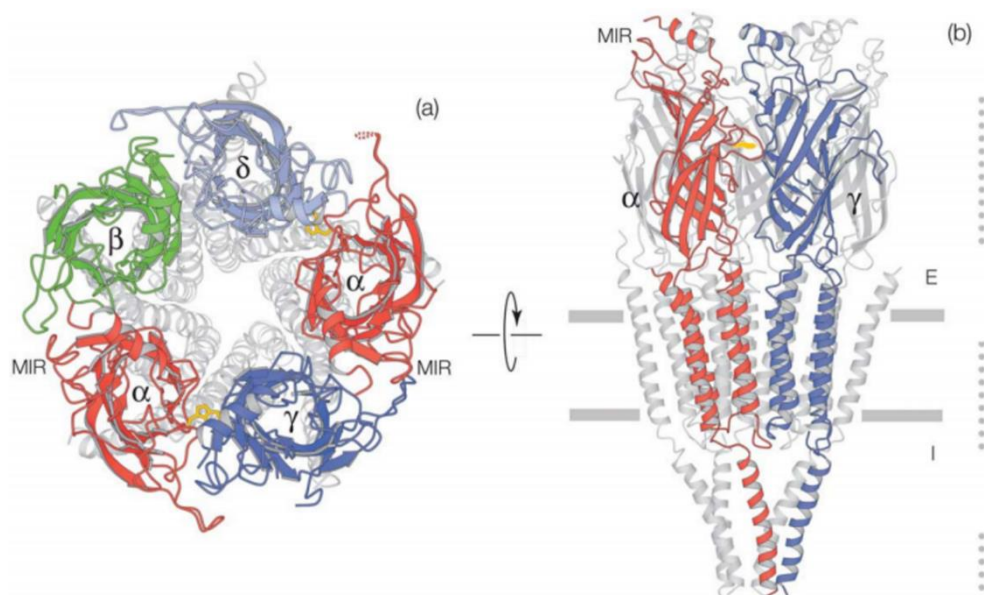


Figura 8. Estructura tridimensional refinada del receptor nicotínico de *Torpedo*. (a) Vista frontal a la hendidura sináptica. (b) Vista lateral a la membrana celular (Unwin, 2005).

Los estudios realizados a los receptores nicotínicos sintetizados por éstas especies animales han ayudado a definir detalladamente los sitios de unión de los receptores nicotínicos a nivel molecular. Se ha determinado que los sitios de unión a ligando en los receptores homopentaméricos se encuentran entre todas las interfaces de las subunidades que la conforman, por tanto tiene 5 sitios de unión. Mientras que los receptores heteropentaméricos constan de solo 2 sitios de unión, los cuales se encuentran entre las uniones de las subunidades α y β (Figura 9). Los receptores heteropentaméricos funcionales siempre presentan dos subunidades α que contienen el sitio de unión principal con ACh ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ o $\alpha 6$). Otras dos subunidades que no son α que contienen el sitio complementario a la unión con ACh ($\beta 2$ o $\beta 4$). Y una quinta subunidad (en el caso del receptor nicotínico muscular es $\beta 1$) que no participa en la unión a ACh ($\alpha 5$, $\beta 3$, aunque también pueden ser $\beta 2$ o $\beta 4$) (Gotti et al., 2006). (Figura 9).

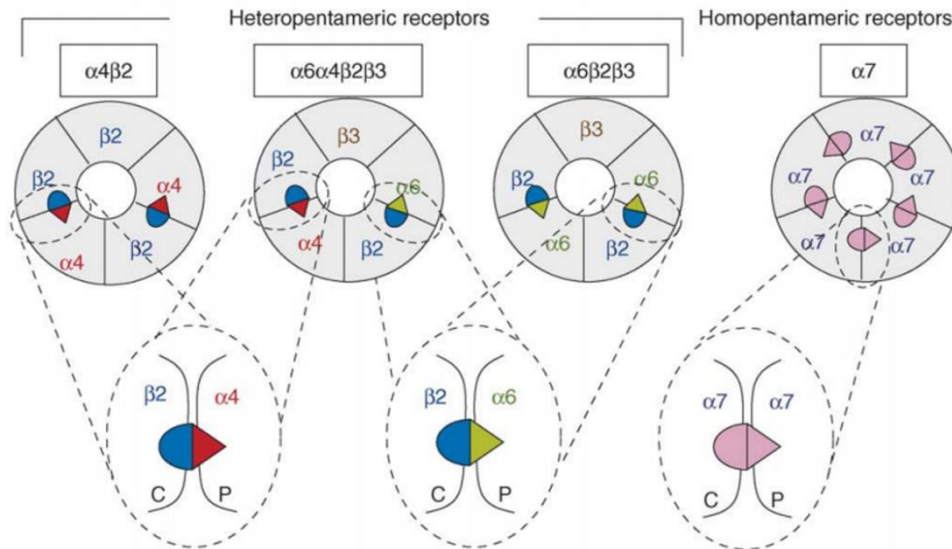


Figura 9. Sitios de unión de la ACh a los receptores nicotínicos heteropentaméricos y homopentaméricos (Gotti et al., 2006).

La unión de la ACh al receptor nicotínico provoca un cambio conformacional en la estructura del canal. Este cambio conformacional permite el flujo de cationes principalmente monovalentes como Na^+ y K^+ , sin embargo también permite el paso de cationes divalentes como Ca^{2+} . La mayor permeabilidad a Ca^{2+} la ha mostrado el receptor nicotínico $\alpha 7$, este juega un papel importante en los delicados procesos fisiológicos donde participa (Pankratov & Lalo, 2014). Se ha mostrado en ratones “knockout” para las subunidades de los receptores nicotínicos en el cerebro han mostrado que estos no son esenciales para la supervivencia o para la ejecución de tareas simples (Gotti et al., 2006). Sin embargo estos receptores juegan un papel importante en el control de procesos como memoria, aprendizaje, cognición, entre otros (Matsubayashi, Amano, Seki, Sasa, & Sakai, 2004; Wang et al., 2014). Los estudios de hibridación demuestran que las subunidades que se expresan en cerebro son $\alpha 2 - \alpha 7$ y $\beta 2 - \beta 4$, siendo las de mayor incidencia $\alpha 7$, $\alpha 4$ y $\beta 2$. (Gotti et al., 2006) (Figura 10).

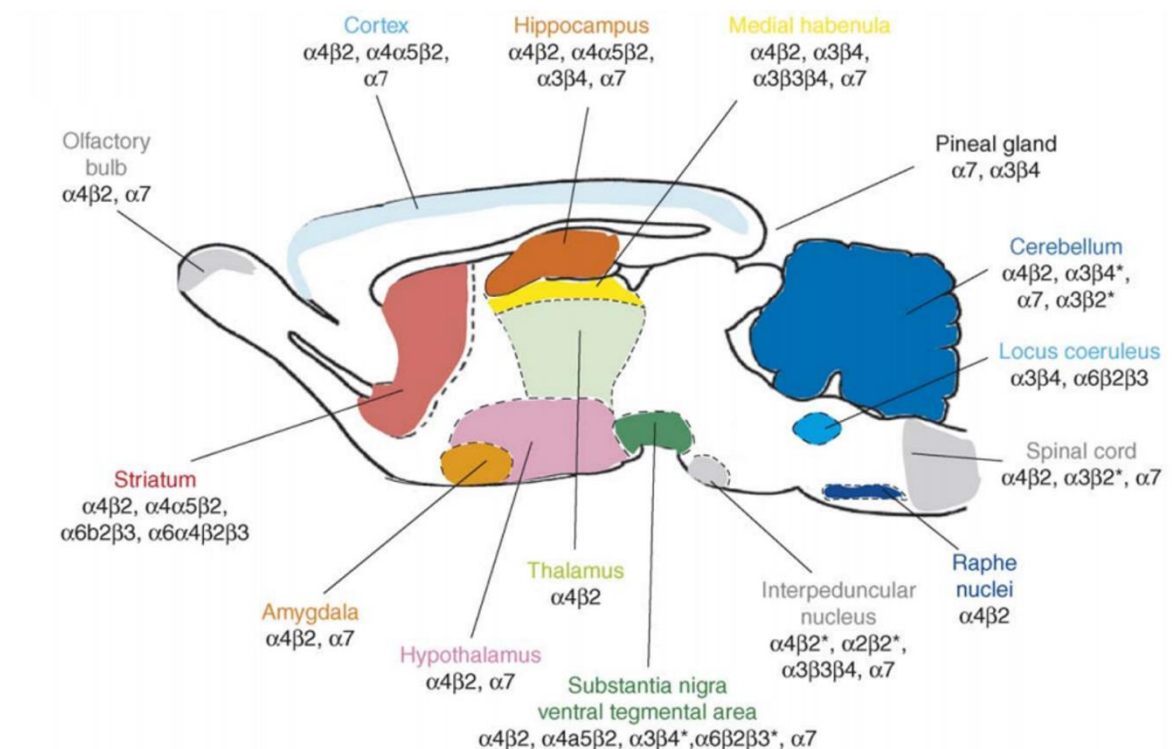


Figura 10. Expresión de diferentes tipos de receptores nicotínicos en cerebro de roedores (Gotti et al., 2006).

La investigación del presente trabajo se enfoca en una región específica del hipocampo, en el siguiente capítulo se mencionaran aspectos importantes sobre las funciones y el papel que desempeña este núcleo profundo del SNC.

VI.VII. Hipocampo

El hipocampo es uno de los hemisferios que constituyen el lóbulo temporal del cerebro y juega un papel muy importante en la memoria a largo y corto plazo y el aprendizaje espacial. Este núcleo profundo cerebral se deriva del telencéfalo y forma parte del sistema límbico. Anatómicamente, está organizado en el cuerno de Amón y el giro dentado (separados por la fisura hipocampal); el complejo subicular, formado por el presubiculum, el subiculum y el parasubiculum; y la corteza entorrinal. El cuerno de Amón (CA) está dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3. simplificará su vez, se dividen en cuatro capas: *stratum oriens* (SO), *stratum radiatum* (SR), *stratum piramidale* (SP) y *stratum lacunosum moleculare* (SLM) (Figura 11). Las principales neuronas del hipocampo son las células

piramidales alineadas en forma de dos a cuatro hileras en el interior de la capa piramidal (Arnáiz, 2008; Olivares, Juárez, & García, 2015).

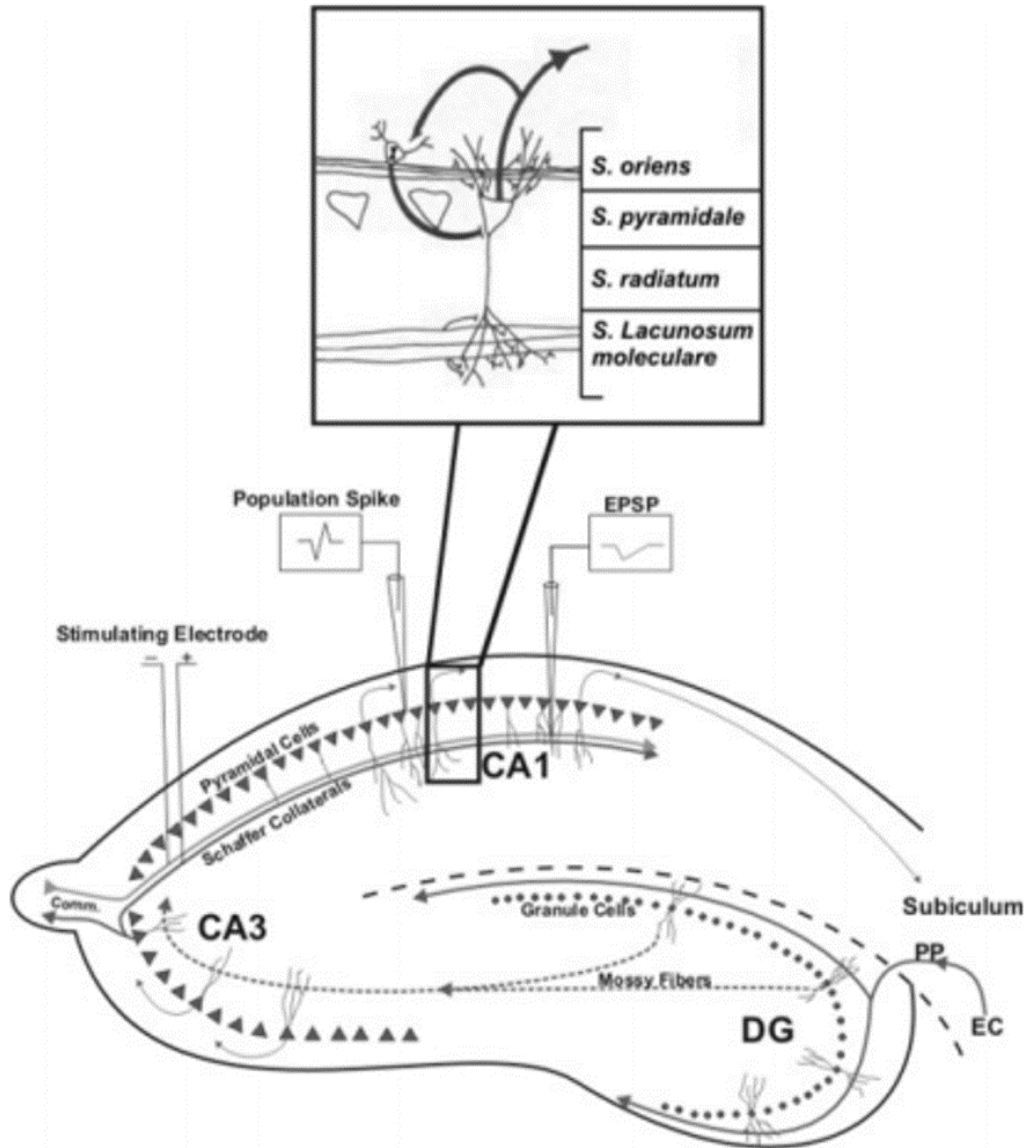


Figura 11. Esquema del hipocampo donde se observa la ubicación de sus cuatro capas más importantes: *stratum oriens* (SO), *stratum radiatum* (SR), *stratum pyramidal* (SP) y *stratum lacunosum moleculare* (SLM) (Arnáiz, 2008).

La mayor entrada de fibras en el hipocampo proviene de la corteza parahipocampal, que es la principal vía de entrada de aferencias neocorticales de procesamiento provenientes de distintas áreas dorsales, como la corteza parietal posterior, la corteza retrosplenial, la corteza prefrontal dorsolateral o de

la parte dorsal del surco temporal superior estructuras estrechamente asociadas en la codificación de la localización espacial de los estímulos. Estas aferencias son distribuidas hacia la corteza entorrinal. Las células de las capas II y III de esta corteza envían sus axones hasta el giro dentado y el hipocampo a través de la vía perforante, atravesando la capa de células piramidales del subiculum. Por otra parte, las neuronas piramidales de la región CA3 proyectan sus axones hacia las dendritas de las neuronas piramidales de CA1, mediante las colaterales de Schaffer. Asimismo, los axones provenientes de la región CA3 proyectan hacia todo el hipocampo mediante proyecciones comisurales entre hemisferios, y/o asociativas en el mismo hemisferio. Mientras que las neuronas granulares del giro dentado proyectan sus axones o fibras musgosas hacia las dendritas proximales de las neuronas piramidales de la región CA3, atravesando el hilus. Este circuito del procesamiento de la información de la memoria declarativa es el llamado circuito trisináptico (Figura 12). La información procesada mediante este circuito trisináptico permite relacionar diferentes aferencias sensoriales pertenecientes a diversos estímulos gracias a que las células piramidales del hipocampo tienen un alto grado de interconexión, facilitando las relaciones entre las diferentes entradas de información (Olivares et al., 2015).

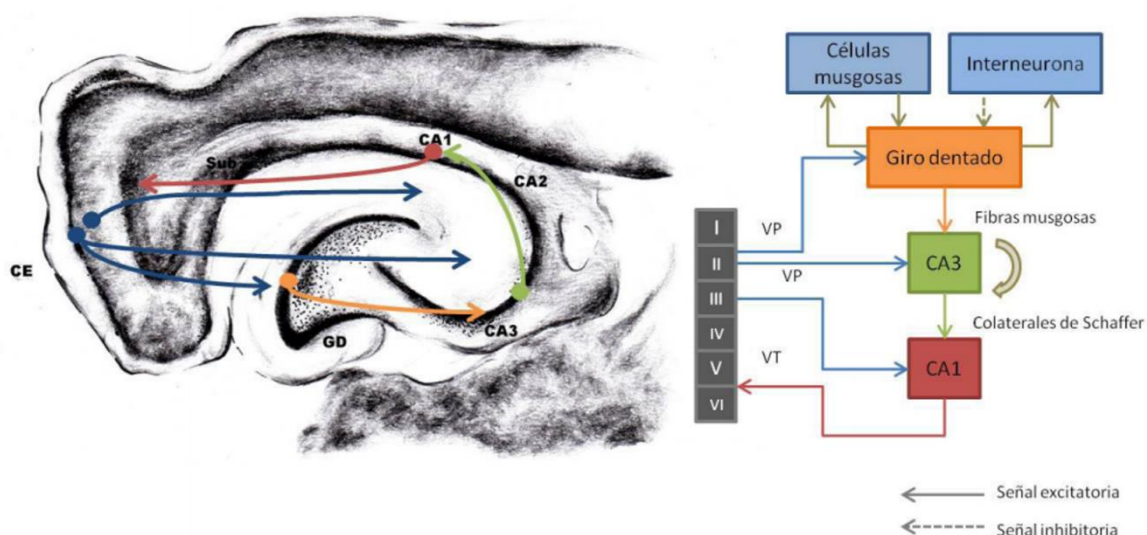


Figura 12. Esquema del hipocampo adulto mostrando la tradicional vía excitatoria trisináptica. Abreviaturas: corteza entorrinal (CE), giro dentado (GD), cuerno de amón (CA), subiculum (Sub), vía perforante y la vía temporoammonica (VT) (Olivares et al., 2015).

Desde el punto de vista psicológico, la memoria se ha dividido de modo adecuado en explícita e implícita (Figura 13). La explícita o declarativa que es la memoria en la que participa el hipocampo junto con otras estructuras cerebrales como los lóbulos temporales mediales, está vinculada con la conciencia (o, como mínimo, con la percepción consciente). Esta memoria se divide en: episódica y semántica. La episódica se ocupa de acontecimientos y la semántica está relacionada con hechos (como palabras, reglas y lenguaje). La memoria explícita (recordación) necesaria inicialmente para actividades, como montar en bicicleta, puede transformarse en implícita una vez que la persona aprendió cabalmente la tarea (Barrett et al., 2010).

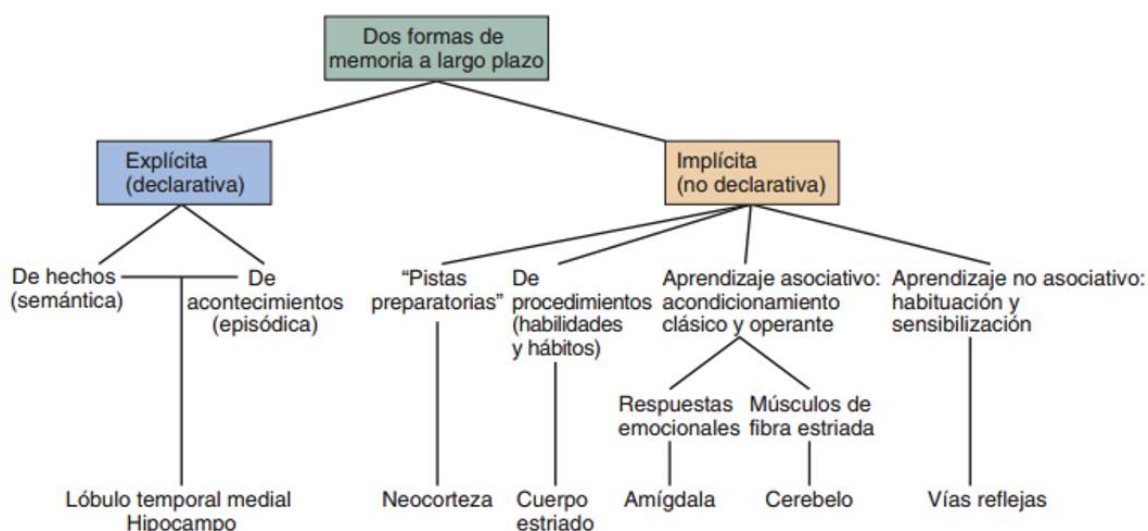


Figura 13. Modalidades de memoria a largo plazo (Barrett et al., 2010).

El giro dentado del hipocampo junto con la zona subventricular de los ventrículos laterales del cerebro de mamífero son los únicos dos sitios de regeneración neuronal durante la etapa adulta, y se sabe que dichas neuronas tienen un papel importante en varias funciones del sistema nervioso central. El fenómeno de producción de nuevas células es conocido con el término de neurogénesis y generalmente se refiere al proceso de proliferación, migración, supervivencia y diferenciación de nuevas células. La posible implicación de la neurogénesis hipocampal en el aprendizaje espacial, podría explicarse considerando que la generación de nuevas neuronas es estimulada por el aprendizaje y éste a su vez es estimulado por la neurogénesis (Olivares et al., 2015).

Los receptores nicotínicos participan de forma activa en el funcionamiento del hipocampo. Los receptores nicotínicos parecen estar implicados en importantes funciones neuronales como la atención, el aprendizaje y procesos de memoria (Garín et al., 2009; Nott & Levin, 2006). Las interneuronas GABAérgicas son las principales dianas de las terminaciones colinérgicas que llegan al hipocampo. En el hipocampo existen distintos subgrupos de interneuronas, según la expresión de receptores nicotínicos en las mismas (Albuquerque et al., 2009). Alkondon y Albuquerque en 2004 mencionan la presencia de al menos tres diferentes tipos de cinéticas generadas por los receptores nicotínicos en el hipocampo. Corrientes **tipo I** con un rápido decaimiento de su corriente nicotínica, es generada por receptores $\alpha 7$ sensibles a metilconitina o α -bungarotoxina; Corrientes **tipo II** con un decaimiento lento, la cual es generada por receptores $\alpha 4\beta 2$ sensibles a la dihidro- β -eritroidina; Corrientes **tipo III** con un decaimiento muy lento, generada por receptores $\alpha 3\beta 4$ y que son sensibles a mecamilamina. Cabe señalar que ellos mencionan que en investigaciones más detalladas se describen corrientes con cinéticas distintas a las cuales se refieren como corrientes tipo IV seguramente generadas por los otros distintos tipos de receptores nicotínicos conformados por diferentes subunidades (Manickavasagom Alkondon & Albuquerque, 2004).

VI.VIII. *Stratum oriens*

El hipocampo cuenta con una estructura laminar de tres capas: La capa molecular, la capa piramidal y la capa oriens. La capa o el *stratum oriens* es una zona importante del hipocampo, está conformada por las dendritas basales de las neuronas piramidales y en ésta se encuentran una gran cantidad de interneuronas que parecen ser las responsables de la actividad y regulación intrínseca del hipocampo (Alcaraz, 2001). Estas interneuronas como se mencionó anteriormente son de naturaleza inhibitoria. El estudio sobre el papel que desempeñan los receptores nicotínicos en cerebro es relativamente reciente. McQuiston y Madison en 1999 realizaron un sondeo de respuestas generadas por receptores nicotínicos expresados por diferentes interneuronas en el cuerno de amón 1. Con base a sus hallazgos las clasificaron en tres categorías, de

acuerdo con sus respuestas nicotínicas: a) respuesta con decaimiento rápido generado por receptores nicotínicos $\alpha 7$ en todas las capas de CA1, b) doble respuesta, una de receptores nicotínicos $\alpha 7$ y otra lenta generada por receptores nicotínicos diferentes a $\alpha 7$, estas interneuronas las encontraron principalmente en el *stratum oriens*, c) sin respuestas nicotínicas las cuales encontraron cerca del *stratum piramidale* (McQuiston & Madison, 1999). Más tarde en trabajos de otros grupos encontraron resultados similares (M Alkondon & Albuquerque, 2001; Sudweeks & Yakel, 2000). Las cinéticas características generadas por receptores nicotínicos se muestran en la figura 14. En el estrato donde se encuentran las neuronas piramidales no se genera ninguna respuesta nicotínica,. Se llegan a registrar respuestas nicotínicas muy pequeñas en comparación a las que generan las interneuronas, debido a que las neuronas piramidales son de tipo glutamatérgicas. En el *stratum radiatum* donde encontramos un gran número de interneuronas las respuestas generadas son principalmente por receptores nicotínicos $\alpha 7$. Finalmente, en el estrato *oriens* se encuentran las respuestas generadas por receptores nicotínicos diferentes a los $\alpha 7$ que tienen una corriente más lenta, aunque cabe mencionar que también encontramos respuestas de receptores nicotínicos $\alpha 7$, o ambas en una misma interneurona. La cinética más lenta es característica del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ que está ampliamente distribuido en el cerebro, incluyendo el hipocampo, sin embargo no es el único receptor heteromérico que encontramos en el hipocampo y en particular en el estrato *oriens* (Sudweeks & Yakel, 2000).

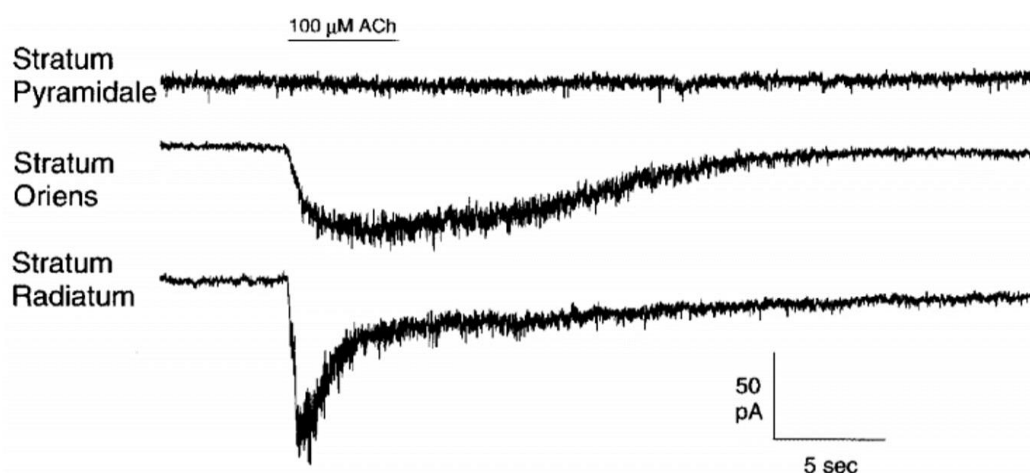


Figura 14. Tipos de corrientes generadas por receptores nicotínicos en diferentes estratos del hipocampo, (Sudweeks & Yakel, 2000).

Albuquerque y su grupo en 2009 proponen cómo se lleva a cabo la regulación inhibitoria en el hipocampo por medio de las interneuronas de CA1 que expresan receptores nicotínicos. Podemos observar las neuronas piramidales excitatorias glutamatérgicas de color verde en el estrato piramidal y una interneurona piramidal asociada GABAérgica de color azul fuerte. Ambas neuronas extienden sus dendritas hacia el estrato radiatum donde interaccionan con las colaterales de Schaffer (Schaf. Col.) y al estrato lacunoso-molecular donde interactúan con las fibras de la vía perforante (PPF). Los axones de las piramidales excitatorias se proyectarán hacia regiones superiores del cerebro. Las interneuronas GABAérgicas llevarán a cabo un papel intrínseco, solamente algunas piramidales GABAérgicas van a proyectar sus axones a regiones superiores del cerebro a través del alveus (alv) (Albuquerque et al., 2009).

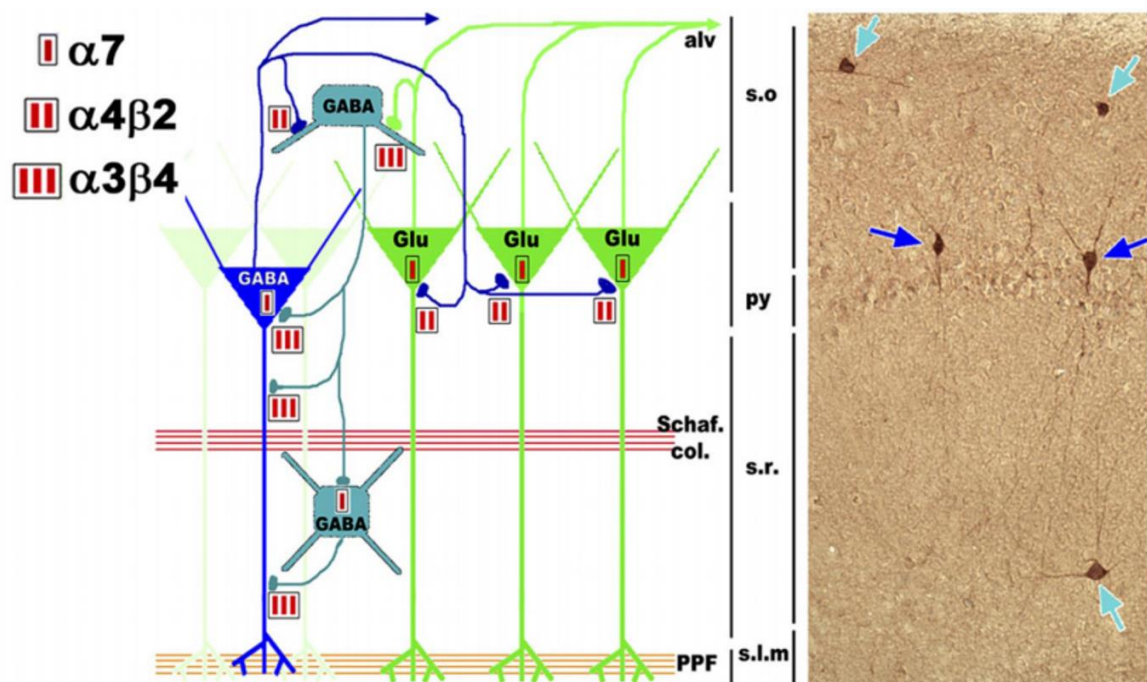


Figura 15. Modulación inhibitoria de las diferentes interneuronas GABAérgicas que expresan receptores nicotínicos en CA1 del hipocampo, Abreviaturas: Alveus (alv), stratum lacunoso-molecular (s.l.m.), *stratum oriens* (s.o.), stratum piramidal (py), stratum radiatum (s.r), Fibras de la vía perforante (PPF), GABAérgica (GABA) y Glutamatérgica (Glu) (Albuquerque et al., 2009).

VI.IX. Enfermedades relacionadas con receptores nicotínicos del hipocampo

Como se ha mencionado a lo largo de este escrito los receptores nicotínicos se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del sistema nervioso central y están implicados en una variedad de funciones cerebrales, entre las que podemos destacar el desarrollo neuronal, la formación de la memoria y el aprendizaje y en el sistema de recompensa neuronal (Jones, Sudweeks, & Yakel, 1999). La nicotina es quizás la droga más adictiva que se usa sin ningún tipo de restricción, 95 % de las personas adictas al tabaco que intentan dejarlo, recaen en menos de un año. El fenotipo y el uso crónico de la nicotina están asociados con cambios fisiológicos en la expresión y función de los receptores nicotínicos. Particularmente la administración crónica de la nicotina induce la sobreexpresión del receptor nicotínico nAChR $\alpha 4\beta 2$ al cual tiene una alta afinidad (Albuquerque et al., 2009; Hogg & Bertrand, 2004). Sin embargo en procesos de uso crónico reduce la función de este debido a la desensibilización, lo que finalmente ocasiona tolerancia a dicho alcaloide (Albuquerque et al., 2009). Tapper y su equipo de investigación identificaron que una mutación puntual en la proteína $\alpha 4$ aumentaba considerablemente el efecto de la nicotina sobre el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ y menciona que con bajas dosis de nicotina en estas condiciones la activación de receptores $\alpha 4$ es suficiente para producir dependencia, tolerancia y sensibilización (Tapper et al., 2004). Esto nos muestra la facilidad con la cual la nicotina puede generar adicción.

El tabaquismo es considerado una epidemia y es un problema a nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta adicción el segundo lugar de causa de muerte en el mundo. Esto está relacionado con las enfermedades ligadas tales como el desarrollo de cáncer en diferentes órganos del cuerpo y enfermedades cardiovasculares (Kuri-Morales, González-Roldán, Hoy, & Cortés-Ramírez, 2006). Sin embargo no solo este tipo de enfermedades se encuentran ligadas a este problema, ya que también se encuentra relacionado con alteraciones psiquiátricas.

Los receptores nicotínicos están relacionados con varias enfermedades neurodegenerativas, psiquiátricas y algunos tipos de epilepsia, como la de lóbulo temporal que es la más común en humanos (López & Solís, 2012). Por el lado de las enfermedades neurodegenerativas encontramos la enfermedad de Parkinson y Alzheimer, que se desarrollan al paso del tiempo cuando la persona empieza a presentar los síntomas generados por el mal funcionamiento del sistema colinérgico (Orta-Salazar, Cuellar-Lemus, Díaz-Cintra, & Feria-Velasco, 2014; Xie, Gao, Xu, & Meng, 2014). Por otro lado encontramos las enfermedades de tipo psiquiátrica tales como depresión mayor, esquizofrenia, síndrome de Tourette, trastorno maníaco-depresivo, trastorno de hiperactividad con déficit de atención y trastorno obsesivo-compulsivo. Este tipo de trastornos del sistema colinérgico empeoran cuando el paciente es adicto a la nicotina, sin embargo los desórdenes psiquiátricos que tienen una mayor comorbilidad con los efectos de la nicotina son la esquizofrenia y la depresión (Molero & Muñoz, 2005). Entre los trastornos psicóticos la esquizofrenia tiene el peor pronóstico ya que ocasiona deterioro en casi todas las funciones psicológicas y dificulta la adaptación social, académica y laboral. Su inicio y los cambios que conlleva pueden observarse como un deterioro lento y gradual (Cano et al., 2007).

El papel que juegan los receptores nicotínicos en el SNC necesita ser investigado a detalle, es crucial identificar el papel que desempeñan las diferentes subunidades de receptores nicotínicos en las vías de señalización de las neuronas y su relación intrínseca con otros receptores. De manera bilateral, es necesario el desarrollo de nuevas herramientas farmacológicas para identificar mejor los subtipos de receptores nicotínicos nativos expresados en las células neuronales y no neuronales en el sistema nervioso. De esta forma podremos comprender de una mejor manera el papel que desempeñan estos receptores en los procesos psicóticos y enfermedades relacionadas con estos receptores. La búsqueda de fármacos selectivos para los diferentes receptores nicotínicos es un paso crucial para el desarrollo de medicamentos que coadyuden en el tratamiento de los diferentes tipos de trastornos neurológicos que afectan la calidad de vida de las personas que padecen este tipo de anomalías (Albuquerque et al., 2009).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Colecta y preparación del material biológico de *Erythrina coralloides* DC.

La recolecta de muestras de semillas de *E. coralloides* se realizó el año 2014 durante los meses de junio–septiembre, en los jardines de la Universidad Autónoma de Chapingo ubicada en el municipio de Texcoco de Mora, en el Estado de México (19° 29' 29.4" N, 98° 53' 05.5" W). Se cosecharon las vainas maduras y se seleccionaron las semillas sanas, posteriormente se secaron en una estufa a una temperatura de 60 °C por tres días. El material totalmente seco se trituró en un molino hasta obtener partículas finas y se guardaron en bolsas en un refrigerador a 5 °C hasta el momento en que se inició la extracción de alcaloides.

2.- Identificación taxonómica

Los ejemplares recolectados fueron depositados en el herbario-hortorio CHAPA de la especialidad de Botánica del Colegio de Postgraduados campus montecillos para su correcta determinación taxonómica.

3.- Extracción de alcaloides

La extracción se realizó de acuerdo al método descrito por Games *et al.* 1974 citado por Sánchez (2000). Las semillas de *E. coralloides* se secaron en una estufa a 35 °C hasta obtener un peso constante, posteriormente fueron molidas mecánicamente en un molino tradicional. Una vez trituradas, las semillas (1 kg) fueron colocadas en un cartucho hecho de papel filtro Whatman No. 42 para desengrasar la muestra con hexano por medio de un sistema Soxhlet, en donde se mantuvo en reflujo durante 48 horas a una temperatura entre 68-70 °C. El extracto se concentró en un rotavapor BUCHI R-114 con temperatura y presión reducida. Se lavó con ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 2 % se filtró y se extrajo con 100 mL de cloruro de metileno (CH₂Cl₂) tres veces (x3) en un embudo de separación. Después se basificó ajustando el pH hasta llegar aproximadamente a 8 usando

bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Nuevamente se extrajo con 100 mL de cloruro de metileno (x3) en un embudo de separación. Finalmente se evaporó en un rota evaporador a temperatura ambiente el disolvente y se obtuvo la fracción de alcaloides libres solubles en hexano.

El material vegetal seco y desengrasado se introdujo en el sistema Soxhlet con metanol durante 48 horas. El extracto se concentró en un rota evaporador a temperatura y presión reducida. Se lavó con ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 2 %, se filtró y se extrajo con 100 mL de cloruro de metileno (CH_2Cl_2 x 3) en un embudo de separación. Después se ajustó el pH a 8 usando bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Nuevamente se extrajo con 100 mL de cloruro de metileno (x3) en un embudo de separación. Finalmente en un rota evaporador se evaporó a temperatura ambiente el disolvente y se obtuvo la fracción de alcaloides libres solubles en metanol.

La fase acuosa (residuo producto de la extracción con metanol) se acidificó hasta obtener un pH de 2 con ácido clorhídrico concentrado (HCl) y se mantuvo en un sistema de reflujo a una temperatura de 60 a 70 °C durante 3 horas, para hidrolizar los alcaloides esterificados. Posteriormente la solución se elevó hasta un pH básico de 8 con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y se extrajo con 100 mL de cloruro de metileno (x3) en un embudo de separación. Finalmente, se evaporó el disolvente en un rota evaporador para obtener la fracción de alcaloides hidrolizados solubles en metanol.

4.- Identificación de alcaloides presentes en los extractos por medio del reactivo de Dragendorff.

Para identificar y separar preliminarmente los alcaloides obtenidos de cada fracción se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina (CCF). Se emplearon placas de gel de sílice de 10 x 10 cm y se usó como eluyente una mezcla de cloruro de metileno : metanol en proporción 9 : 1 respectivamente, éstos se vertieron en una cámara cromatográfica. Una vez finalizada la separación y totalmente evaporado el eluyente se observó la placa en una lámpara de luz UV

de onda larga y corta, posteriormente se revelaron con el reactivo de Dragendorff para poder observar con luz visible los compuestos de tipo alcaloide.

Los extractos solubles en hexano y metanol junto con la fracción obtenida de la hidrólisis ácida se mantuvieron en refrigeración hasta su uso sobre las interneuronas colinérgicas del *stratum oriens* con la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa como lo describe (Hamill, Marty, Neher, Sakmann, & Sigworth, 1981).

5.- Cromatografía preparativa y resonancia magnética nuclear (RMN- H¹)

Se prepararon seis placas de vidrio de 20 x 20 cm con una cubierta de silica gel Merck con un espesor de 0.5 mm. Se aplicó 35 mg disueltos en diclorometano del extracto soluble en hexano en la placa y se dejó secar para posteriormente ser transferida a una cámara cromatográfica. Dicha cámara se saturó previamente con un eluyente constituido por diclorometano y etanol en una proporción 9:1 respectivamente. Una vez finalizado el proceso de separación la placa se colocó en una campana de extracción de gases para la eliminación de los disolventes. Ya que la placa se encontró libre del eluyente se observó en una cámara de luz UV de onda larga y corta. Posteriormente una parte de la placa fue revelada con el reactivo de Dragendorff para poder identificar las bandas que dieron positivo a esta prueba para alcaloides.

Se realizó un análisis a las bandas de la muestra fraccionada de los alcaloides solubles en hexano por resonancia magnética nuclear de protón. Se utilizó un espectrómetro Bruker-360 de 600 MHz.

6.- Registro electrofisiológico por medio de la técnica de fijación de voltaje en la modalidad de célula completa.

Los cerebros de rata que se utilizaron para la experimentación fueron obtenidos de ratas macho Sprague Dawley de 13 a 17 días postnatales. Las ratas fueron colocadas en un envase sellado con isoflurano hasta quedar totalmente anestesiadas. Ya que la rata no mostraba reacción alguna se realizó una inyección directa al corazón de una solución a una temperatura de

aproximadamente 7 °C que contenía (en mM): 250 de sacarosa, 2.5 de cloruro de potasio (KCl), 1.2 de bisfosfato de sodio (NaH₂PO₄), 5 de cloruro de magnesio (MgCl₂), 0.5 cloruro de calcio (CaCl₂), 26 bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 10 glucosa, pH 7.4. Inmediatamente se decapitó la rata con ayuda de pinzas y tijeras de disección, una vez extraído el cerebro se trabajó con oxigenación constante del tejido, el cerebro se colocó en un vaso de precipitado con 100 mL de solución cerebro espinal artificial que contiene (en mM): 125 de cloruro de sodio (NaCl), 2.5 de cloruro de potasio (KCl), 1.23 de bisfosfato de sodio (NaH₂PO₄), 1 de cloruro de magnesio (MgCl₂), 2 cloruro de calcio (CaCl₂), 26 bicarbonato de sodio (NaHCO₃), 10 glucosa, pH 7.4 y se preparó el equipo para realizar las rebanadas coronales de cerebro. Para obtener las rebanadas de 350 µm de grosor se utilizó un Vibratomo Leica VT 1000 el cual tiene un compartimiento donde se agregó la solución cerebro espinal artificial y se colocó el cerebro en la posición correcta para ser cortado, con el apoyo del atlas The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates cuarta edición (Paxinos & Watson, 1998). Se identificó el hipocampo. Una vez realizado el corte del cerebro las rebanadas fueron colocadas en solución cerebro espinal artificial a temperatura ambiente y se dejaron reposar una hora y media aproximadamente antes de realizar los registros eléctricos.

Después, se tomó una rebanada y se cortó para solo utilizar un hemisferio, esta mitad fue colocada en una cámara de perfusión de un microscopio Olympus BX51WI, la cual se mantuvo perfundida a una velocidad de aproximadamente 2 mL/min con solución cerebro espinal artificial y oxigenación constante. Ya que la rebanada se encontró en las condiciones y en la posición adecuada se procedió a buscar la zona de interés. Por medio de uno un sistema de vídeo del microscopio y un par de brazos electromecánicos se ubicó una interneurona del *stratum oriens* del cuerno de amón 1 del hipocampo, el primer criterio de selección de las interneuronas fue su aspecto físico: un tamaño de 10 a 20 µm, membrana sin puntos negros signo de necrosis y volumen normal. Una vez elegida una célula con estas características por medio de los brazos mecánicos se acercaron las dos micropipetas hechas de vidrio de borosilicato Sutter instrument. La primer micropipeta con función de microelectrodo contiene la

solución interna constituida por (en mM) 140 gluconato de K, 10 HEPES, 2 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 10 EGTA y 2 Mg ATP, pH 7.4 y resistencia entre 4 y 8 MΩ, es con la que se realizó el sello para el registro eléctrico. Primero se lleva la punta del electrodo al campo de la interneurona, una vez en el mismo se cambia el programa a movimientos más lentos, en este modo se lleva la punta del electrodo hasta que toque la membrana de la célula, ya que la punta ejerce una pequeña presión sobre la membrana se realiza una ligera succión, cuando se observa un aumento en la resistencia de la membrana superior a 1 GΩ se considera que se ha llegado al gigasello. Inmediatamente se fija la membrana a -70 V y se realiza otra pequeña succión, la cual rompe la membrana que está por debajo de la pipeta y une toda la célula al electrodo, de esta forma se puede registrar los cambios eléctricos de la interneurona.

Una vez que la célula se encontró estable la segunda micropipeta se acercó al campo de esta, dicha micropipeta contenía acetilcolina a una concentración 3 mM y estaba unida a una bomba de aire. La punta de esta se colocó a una distancia de entre 10 y 15 μm y se aplicó ACh a presión por un tiempo breve (500 ms) en el espacio de la interneurona. En este momento se aplicó el segundo criterio de selección, si la interneurona no mostraba una respuesta eléctrica (corriente entrante) indicaba que esta interneurona no expresaba los receptores nicotínicos. Sí dicha neurona era estimulada por la ACh generenado una corriente entrante transitoria, daba inicio el experimento. Se aplicaba ACh cada cinco minutos. Sí la neurona registraba tres entradas de corriente o más con valores similares, debido a la activación de sus canales nicotínicos, se iniciaba la aplicación de los extractos de alcaloides de *E. coralloides*. Para manejar una concentración relativa de los extractos se hizo una inferencia del peso molecular del conocido esqueleto eritrinano, el cual es la estructura general de los alcaloides de las especies del genero *Eritrina*. El peso molecular del esqueleto es de 229.4 g/mol, este se tomó como referencia para el peso relativo de los extractos, de esta forma todos los extractos tuvieron el mismo error. Se aplicó por medio de un sistema de perfusión por gravedad durante 10 minutos a una velocidad de aproximadamente 2 mL/min con solución cerebro espinal artificial que contenía uno de los extractos a una concentración relativa de 1 mM

y 0.01 % de dimetilsulfoxido (v/v). De esta forma evaluamos el efecto de los extractos sobre los receptores nicotínicos de las interneuronas del *stratum oriens*.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Recolección de semillas de *E. coralloides*

Se colectaron 5 muestras florales con fruto de *E. coralloides* (Figura 16) en los jardines de la Universidad de Chapingo, cerca del municipio de Texcoco de Mora, Estado de México. Los ejemplares recolectados fueron depositados en el herbario CHAPA de la especialidad en Botánica del Colegio de Postgraduados para su determinación taxonómica.



Figura 16. Flor, vainas, semillas y árbol de *E. coralloides*.

Posterior a la temporada de floración primaveral de los árboles de *E. coralloides* y que los frutos ya contenían semillas maduras, entonces fueron colectadas . Se llevaron a cabo 5 colectas durante los meses de julio-agosto de las cuales se obtuvo un peso fresco de semillas de 14.59 kg.

Estas semillas fueron secadas en bolsas de papel en estufa a una temperatura entre 55 a 60 °C por 3 días. Ya secas se volvieron a pesar y se obtuvo un peso

seco de semillas de 13.5 kg. El porcentaje total de agua en las semillas fue 7.47 %, el cual se obtuvo con la fórmula $\% \text{ de agua} = \frac{PF-PS}{PF} \times 100$, donde PF = Peso fresco y PS = Peso seco. Cabe mencionar que al secar uno de los lotes de semillas la estufa se salió de control y se elevó su temperatura a tal punto que algunas semillas se quemaron, estas fueron separadas y eliminadas, así como otras que se encontraron parasitadas por un brúquido *Specularius impressithorax* (Pic). Totalmente seco el material se guardó a -10 °C para evitar la degradación de los compuestos hasta su manipulación.

2.- Extracción de alcaloides de semillas de *E. coralloides*

Se utilizaron 3 kg de semillas molidas de *E. coralloides* para la extracción de los alcaloides. Las extracciones se realizaron por separado utilizando un sistema soxhlet, y se obtuvieron tres extractos uno en hexano, otro en metanol y otro del residuo acuoso del extracto en metanol. En la siguiente tabla las diferentes fracciones obtenidas de los tres extractos y se expresan en mg por 100 g de semillas secas.

Tabla 3. Rendimiento de los extractos por cada 100 gramos de semillas.

<i>Muestra vegetal</i>	<i>Fracción hexano</i>	<i>Fracción metanol</i>	<i>Fracción hidrolizada</i>
<i>Semillas (100 g)</i>	13.07 mg	90.90 mg	15.97 mg

De las fracciones anteriores se realizaron cromatografías en capa fina en placas de silica gel de 2 x 5 cm para corroborar que contenían alcaloides. La fase móvil que se utilizó se hizo con diclorometano: etanol en una proporción 9: 1. Se observó en una cámara de luz ultravioleta de onda larga y de onda corta y finalmente se reveló con un el reactivo de Dragendorff específico para alcaloides. A continuación en las figuras 17, 18 y 19 se muestran las imágenes de las placas cromatográficas.

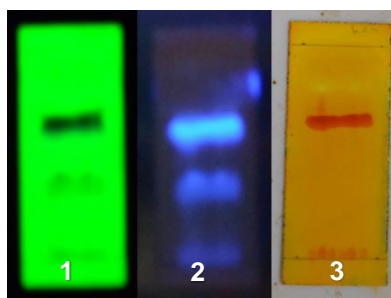


Figura 17. Placa cromatográfica de alcaloides libres de la fracción en hexano observados a luz ultravioleta de onda larga (1), corta (2) y a luz visible (3) con reactivo de Dragendorff.

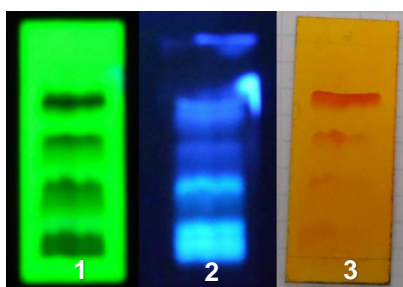


Figura 18. Placa cromatográfica de alcaloides libres de la fracción en metanol observados a luz ultravioleta de larga (1), corta (2) y a luz visible (3) con reactivo de Dragendorff.

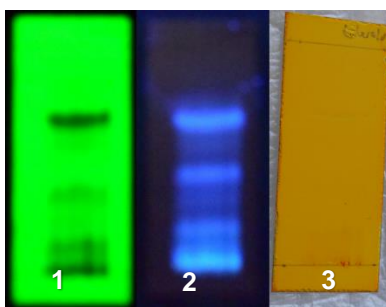


Figura 19. Placa cromatográfica de alcaloides liberados de la fracción obtenida por hidrólisis de la fase acuosa del extracto en metanol observados a luz ultravioleta de onda larga (1), corta (2) y a luz visible (3) con reactivo de Dragendorff.

Estos extractos de alcaloides de semillas de *E. coralloides* son los que se utilizaron sobre las interneuronas del *stratum oriens* del CA1 del hipocampo de ratas Sprague Dawley.

3.- Efecto de extractos de alcaloides de *E. coralloides* sobre interneuronas del *stratum oriens*

Durante el proceso de experimentación electrofisiológica que se realizó en interneuronas localizadas en el *stratum oriens* de ratas Sprague-Dawley, se encontraron distintos tipos de señales en respuesta a un pulso de acetilcolina a una concentración 3 mM. Estos diferentes tipos de respuestas son generadas por canales intermembranales que son excitados por este neurotransmisor. Debido a que la ACh es un agonista inespecífico, este activa a todos los diferentes tipos de receptores nicotínicos. En la siguiente imagen se pueden apreciar los diferentes tipos de respuesta que se registraron en este trabajo.

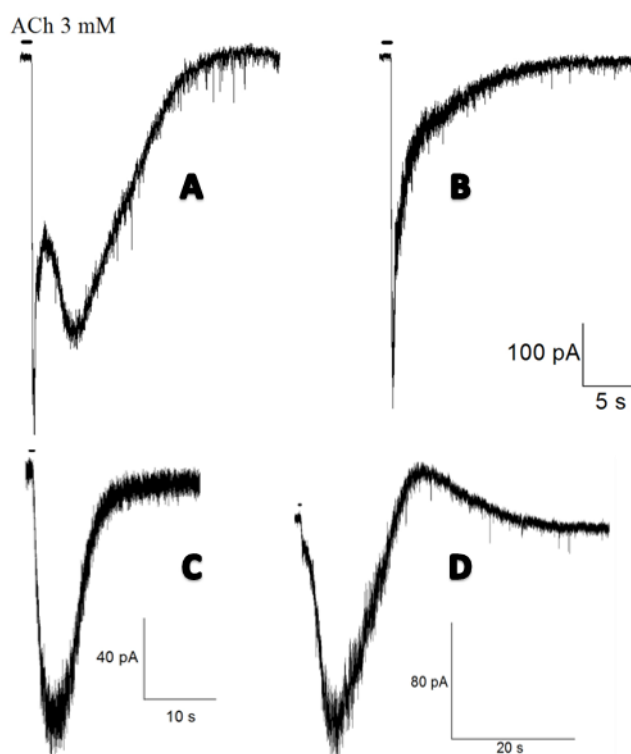





Figura 20. Diferentes tipos de respuesta de interneuronas del *stratum oriens* inducidas por acetilcolina 3 mM.

Los perfiles de corriente iónica de las interneuronas que se observan en la imagen anterior son básicamente las cuatro diferentes que se encontraron en esta zona. El tamaño de estas puede variar, o en el caso de las células que

presentan una doble respuesta la forma podría variar un poco, sin embargo esto depende de la expresión de proteínas de los diferentes tipos de canales de la neurona. Cabe mencionar que la incidencia es distinta para cada tipo de respuesta.

En las respuestas anteriores podemos identificar las tipo I, tipo II y la combinación de ambas mencionadas por Albuquerque (Manickavasagom Alkondon & Albuquerque, 2004). Sin embargo durante los experimentos encontramos un perfil de corriente iónica particular en la cual observamos que después de recuperarse del decaimiento, la corriente aumenta para finalmente llegar a su estado basal inicial (Figura 20D). No podemos saber si este perfil se debe a una subunidad en particular ya que como mencionamos anteriormente la ACh activa todos los diferentes tipos de receptores nicotínicos. Los cuatro extractos de alcaloides que se obtuvieron de las semillas de *E. coralloides* se probaron en estas tres respuestas observando diferentes tipos de efecto antagónico he inclusive un efecto como potenciador de la actividad sináptica. Se sometieron un total de 50 interneuronas a experimentación de las cuales 41 mostraron efecto a la estimulación con ACh 3 mM; las nueve restantes no tuvieron efecto. De estas 41 interneuronas 38 mostraron una cinética que pudimos identificar con las que presentan los especialistas que han realizado registros electrofisiológicos sobre el *stratum oriens* (Manickavasagom Alkondon & Albuquerque, 2004; McQuiston & Madison, 1999; Sudweeks & Yakel, 2000). En la tabla 4 mostramos el número de interneuronas y sus respuestas.

Tabla 4. Respuesta de interneuronas del *stratum oriens* del Cuerno de Amón 1 del hipocampo ante la estimulación con ACh.

Cinética			
Tipo de respuesta	Rápida	Lenta	Dual
No. de neuronas	12	13	13
Porcentaje	31.6 %	34.2 %	34.2 %

Podemos observar que no hay una diferencia marcada en las proporciones en los tres tipos de respuesta a diferencia de McQuiston y Madison (1999), que en sus experimentos realizados sobre el *stratum oriens* de la zona del cuerno de Amón 1 encontraron solamente respuestas rápidas y repuestas duales, en un porcentaje de 32 % y 63% respectivamente. La cantidad de respuestas rápidas en nuestros registros es la misma a la que ellos encontraron con un 31.6 % de incidencia, sin embargo difiere con la cantidad de respuestas duales con un 34.2 %. Estas proporciones quizá difieren por la cepa de rata y por el rango de edad, ya que ellos utilizaron ratas de 15 a 54 días postnatales. Los extractos de alcaloides de *E. coralloides* se probaron en los diferentes tipos de respuestas. Debido a la sensibilidad del ensayo el número de repeticiones de la mayoría es de solo una, de tal modo que nos concentramos en el extracto que mostró el efecto más notorio. A continuación se muestran los resultados de todos los extractos, y posteriormente se enfatiza sobre el extracto antes mencionado. Los extractos mostraron un efecto antagónico sobre las dos tipos de respuestas, cabe mencionar que el ultimo extracto obtenido de la hidrolisis ácida se separó en dos partes, una soluble en metanol y otra en diclorometano. En la gráfica 21 podemos observar el efecto que mostraron sobre la respuesta rápida.

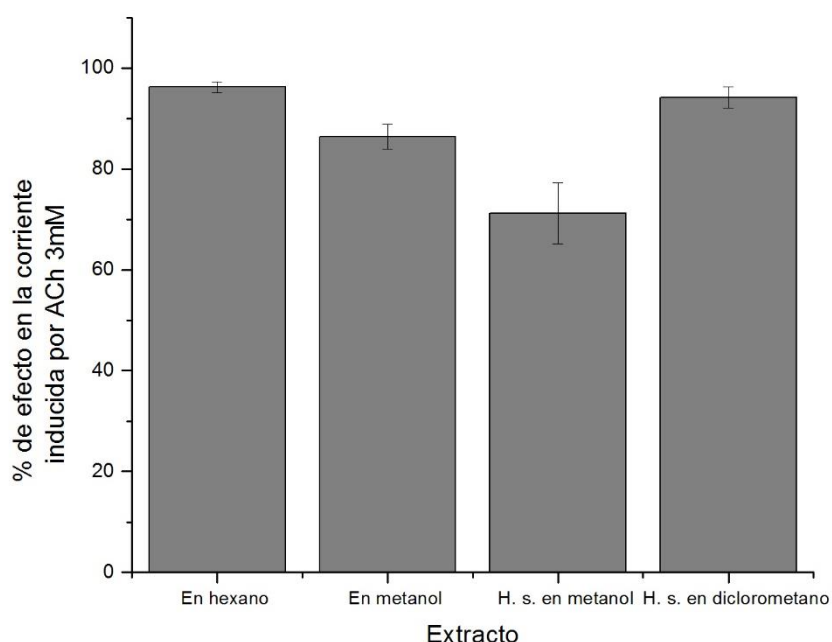


Figura 21. Efecto de los extractos de alcaloides de *E. coralloides* (1 mM) sobre la respuesta rápida de las interneuronas del *stratum oriens* del cuerno de amón 1. (H.s.) Hidrolizado soluble.

En la Figura 21 podemos observar que solo dos de los extractos mostraron efecto sobre la corriente rápida generada por los nAChR $\alpha 7$. El extracto soluble en metanol y el extracto hidrolizado soluble en metanol tuvieron un efecto antagónico reversible del 14 % y el 32 %, respectivamente.

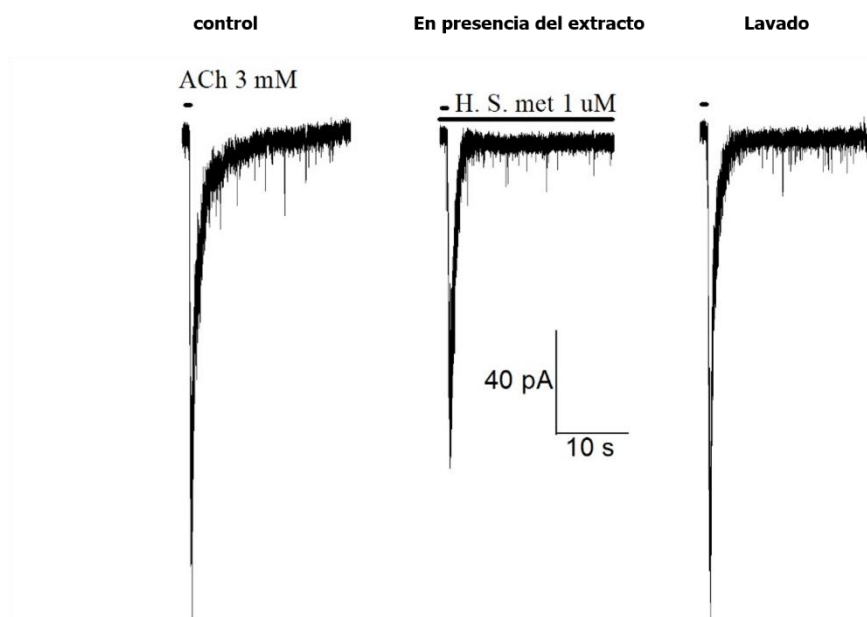


Figura 22. Efecto antagónico reversible del extracto de alcaloides hidrolizados solubles en metanol (1 mM) sobre la respuesta rápida de interneuronas del *stratum oriens*.

En la figura 22 podemos observar el efecto del extracto de alcaloides hidrolizados solubles en metanol mostraron el mayor efecto sobre la respuesta nicotínica rápida. Se puede apreciar claramente la disminución de la corriente entrante en presencia del extracto, y su recuperación total al eliminarlo del medio. Los receptores nicotínicos $\alpha 7$ juegan un papel muy importante en la regulación del hipocampo, muchos autores los consideran con un papel protagónico debido a su alta permeabilidad al catión divalente de calcio (Buhler & Dunwiddie, 2001; Kanno et al., 2005). Cabe mencionar que el efecto es menor comparado con el que se encontró en la respuesta pequeña. Sin embargo cabe resaltar que la dihidro β eritroidina, el principal exponente de los alcaloides del genero Eritrina es considerado un antagonista selectivo de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ (M Alkondon & Albuquerque, 2001), los cuales generan

respuestas lentas. Por tanto es interesante que los alcaloides presentes en estos extractos tengan efecto sobre estas respuestas rápidas, aunado que no tienen ningún tipo de modificación en su estructura.

Los efectos sobre la respuesta lenta como ya se mencionó anteriormente fueron más notorios. Los cuatro extractos tuvieron efecto sobre esta respuesta, sin embargo decidimos concentrar la experimentación sobre el extracto en hexano, ya que fue el que tuvo una mayor inhibición al parecer irreversible. A continuación mencionaremos brevemente el efecto que mostraron los otros extractos, esto debido a que solo tuvieron una sola repetición. El extracto en metanol tuvo un efecto antagónico del 20 %, el extracto hidrolizado soluble en diclorometano mostró un efecto del 60 % y finalmente el extracto soluble en metanol un 45 % de inhibición.

El extracto en hexano mostró un efecto interesante, inhibe aproximadamente un 60 % la corriente nicotínica entrante y aparentemente se une de manera irreversible al receptor nicotínico. Sin embargo esto debe ser corroborado con el compuesto purificado presente en el extracto al que se debe este efecto, ya que por medio de la RMN en este se encontraron los alcaloides erithralina y a la 8-oxo-erithralina, con trazas de erisodina y cristamidina. No obstante es un resultado interesante dada la rareza de los compuestos que se unen de manera irreversible a los canales iónicos. En la figura 23, se muestra un registro característico de una corriente lenta, y el efecto inhibitorio del extracto de hexano. Este efecto es irreversible, ya que aún después de más de una hora de lavado la corriente entrante no se recupera. Cabe mencionar que en algunos registros la corriente se incrementa ligeramente, sin embargo en ninguno de los casos se recupera totalmente (Figura 24).

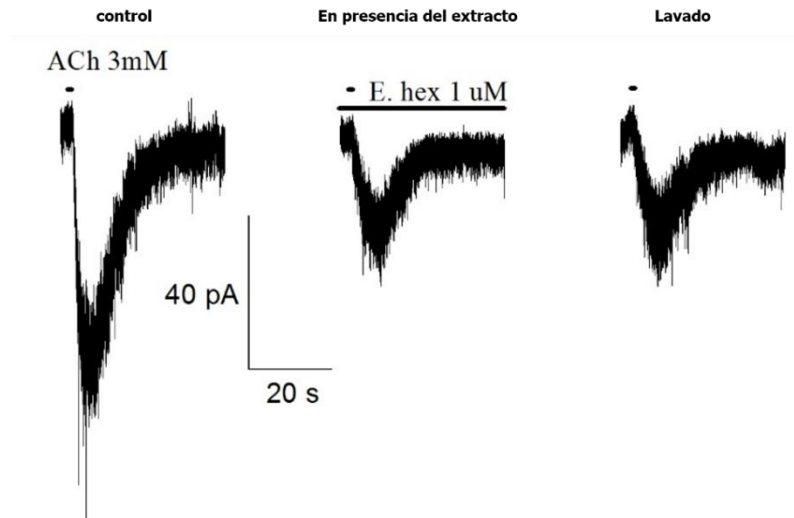


Figura 23. Efecto antagónico irreversible del extracto en hexano de *E. coralloides*. (1 mM) en la respuesta nicotínica lenta de las interneuronas del *stratum oriens*.

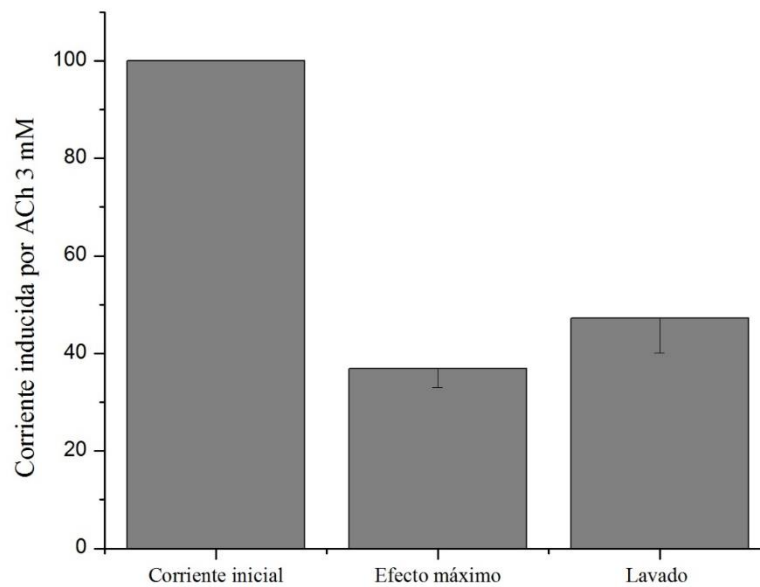


Figura 24. Promedio del efecto del extracto en hexano de *E. coralloides* (1 mM) en la respuesta nicotínica lenta de las interneuronas del *stratum oriens* (n = 6).

Para determinar si la respuesta lenta era generada dependiente de la estimulación de los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, se aplicó dihidro β eritroidina (DH β E) (Tocris; Sigma Aldrich) el antagonista por excelencia para estos receptores. Observamos que aún una concentración de 500 nM, inhibió únicamente el 70 % de la corriente entrante. El hecho de no conseguir inhibir totalmente la corriente a pesar de utilizar una concentración alta del inhibidor,

nos sugirió que probablemente, un receptor distinto al $\alpha 4\beta 2$, se esté expresando en el *stratum oriens*. Esto es apoyado porque además del efecto moderado en la inhibición, también observamos que la DH β E se comportó como un potenciador en presencia del extracto en hexano y la ACh (Figura 25). Este es un efecto atípico que no a sido reportado para este antagonista.

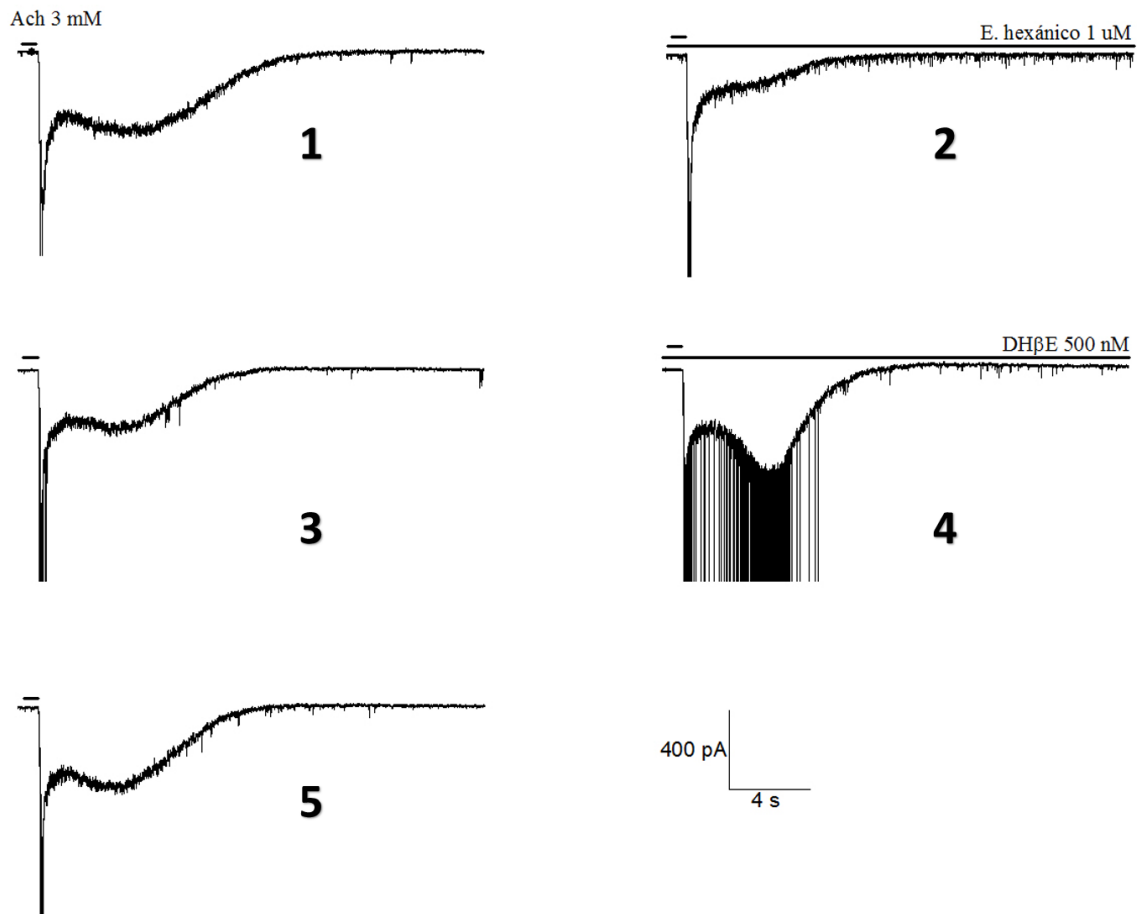


Figura 25. Imagen representativa de la potenciación de la actividad sináptica de la interneurona del *stratum oriens* del cuerno de Amón 1 en presencia de dihidro β eritroidina, el extracto en hexano y acetilcolina. Los siguientes tratamientos se aplicaron a una misma neurona: 1. Se aplicó ACh 3 mM; 2. Se aplicó el extracto en hexano 1 mM, seguido de lavado durante 1 hora; 3) Se aplicó ACh 3 mM; 4) Se aplicó el inhibidor DH β E 500 nM (Sigma - Aldrich), seguido de lavado durante 15 minutos; y 5) Se agregó ACh 3 mM.

Khiroug y su equipo de trabajo en 2004 compararon la respuesta entre el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ y el $\alpha 2\beta 2$ de rata en ovocitos de *Xenopus*. En este trabajo encontraron que las subunidades que conforman el canal $\alpha 2\beta 2$ son

menos sensibles a la DH β E que las α 4 β 2. Proponen que la insensibilidad se puede utilizar para diferenciar las dos diferentes tipos de subunidades, ya que sus características electrofisiológicas son similares y es difícil distinguirlas (Khiroug, Khiroug, & Yakel, 2004). Esta información sugiere la posibilidad de que las respuestas lentas que estábamos registrando se deban a otra composición de subunidades y no a las más abundantes α 4 β 2. Un par de años más tarde Son y Winzer-Serhan (2006), mostraron porque en varias zonas de la corteza y el hipocampo se sobreexpresa la subunidad α 2. Entre las zonas positivas se encontró el *stratum oriens* del cuerno de Amón 1, nuestra zona de estudio. Ellos realizaron un ensayo de doble hibridación in situ en rebanadas de cerebro de ratas de distintas edades y determinaron que la máxima expresión de la subunidad α 2 se da en el día 7 postnatal, sin embargo la proteína aún es detectada en los días posteriores, extendiéndose más allá del día 21 (Figura 26). Recordemos que los sujetos de estudio en nuestro experimento se encontraban entre los 13 y 17 días postnatales (Son & Winzer-Serhan, 2006), lo que apoya que la subunidad α 2 se podría estar expresando en nuestras preparaciones.

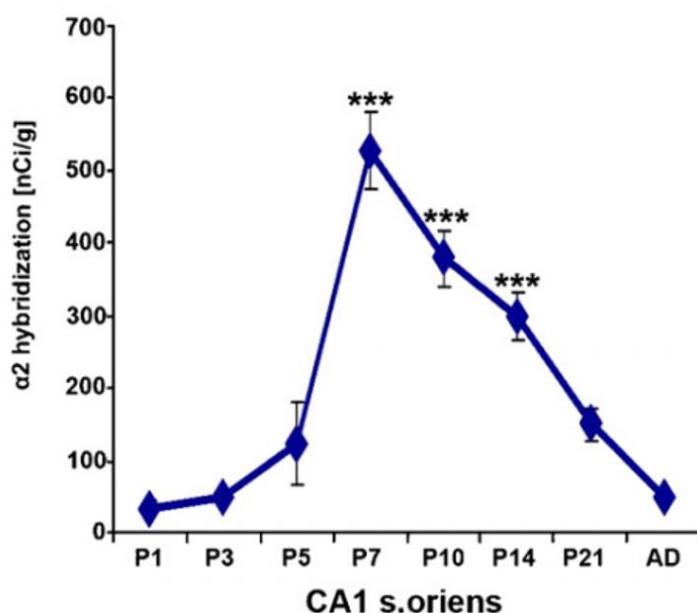


Figura 26. Sobreexpresión de la subunidad α 2 en el *stratum oriens* del cuerno de Amón 1 en ratas de diferentes edades a partir del día posnatal (P) 1 y hasta el día posnatal 21, AD hace referencia a ratas adultas. Modificada de (Son & Winzer-Serhan, 2006).

En un trabajo más reciente de este mismo equipo de trabajo realizado en ratas adultas, demostraron que la subunidad $\alpha 2$ puede jugar un papel en la regulación de la función del *stratum oriens* de CA1, ya que la expresión de $\alpha 2$ es notable en esta zona en comparación con las otras. Al comparar el nivel de expresión de la subunidad $\alpha 4$ con la $\alpha 2$, se observó que no difieren significativamente, la primera se expresa un 13% frente a un poco menos del 10% de la segunda. Sin embargo, la expresión de la subunidad $\alpha 2$ se da principalmente en el *stratum oriens* de CA1, e inclusive como muestran los resultados de estos investigadores la expresión de $\alpha 2$ es mayor que la de $\alpha 4$ en esta zona (Figura 27).

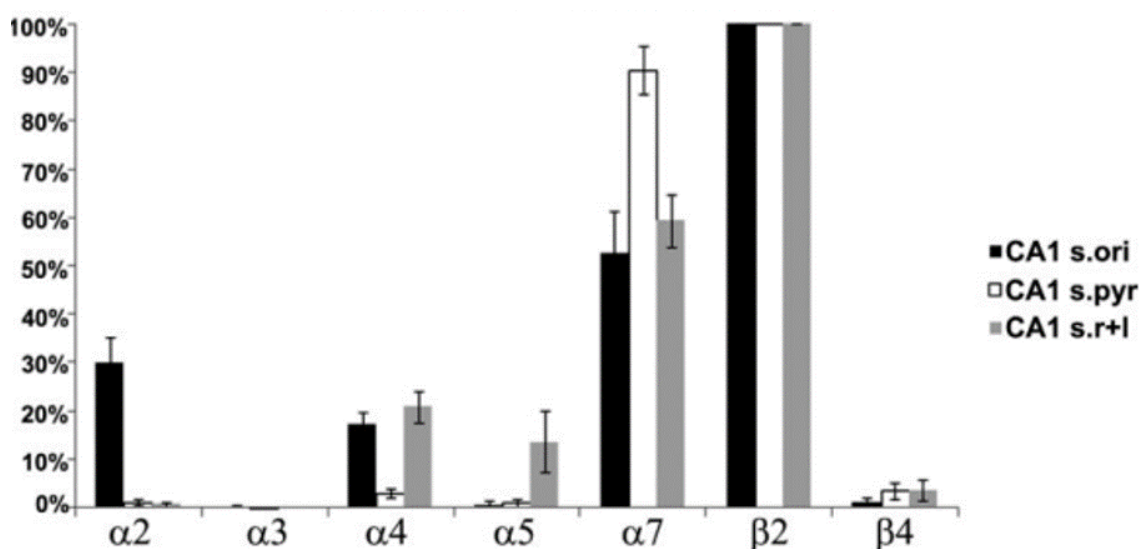


Figura 27. Porcentaje de expresión de las diferentes subunidades en las interneuronas de las diferentes capas del cuerno de Amón 1. Modificado de (Son & Winzer-Serhan, 2008).

Estas investigaciones nos muestran la importancia que pueden tener los diferentes tipos de subunidades, en la delicada regulación de nuestros núcleos cerebrales. La literatura menciona que la subunidad $\alpha 2$ además de jugar un papel muy importante en el desarrollo temprano del cerebro, está relacionada con las potenciaciones de largo plazo, que son importantes para la plasticidad sináptica en el hipocampo (Griguoli, Scuri, Ragozzino, & Cherubini, 2009; Jia, Yamazaki, Nakauchi, Ito, & Sumikawa, 2010; Jia, Yamazaki, Nakauchi, & Sumikawa, 2009). Esta subunidad es afectada por el consumo de cigarrillos, se

menciona que afecta en la regulación que las interneuronas ejercen sobre el hipocampo, además que si es consumido durante el embarazo la nicotina induce la disminución de la expresión de la subunidad $\alpha 2$, lo que conlleva a un desorden en la función y la expresión de este receptor nicotínico en las diferentes capas donde ejerce su regulación fisiológica (Chen, Nakauchi, Su, Tanimoto, & Sumikawa, 2016).

Es importante la búsqueda de nuevos fármacos que tengan especificidad y potencia sobre los distintos receptores nicotínicos, los trabajos sobre este tipo de canales inotrópicos es relativamente reciente. Sin embargo en las plantas tenemos una gama de sustancias químicas que podemos utilizar como fármacos potenciales, para los desórdenes neuronales en los cuales se encuentran inmiscuidos los receptores nicotínicos.

IX. CONCLUSIONES

Se obtuvieron 3 fracciones de las semillas de *E. coralloides* : en hexano, en metanol y liberados en la que se detectaron un alto contenido de alcaloides.

Todas las fracciones extraídas de semillas de *E. coralloides* mostraron un efecto antagónico sobre los receptores nicóticos expresados en interneuronas del *stratum oriens* del cuerno de amón 1.

La fracción de alcaloides liberados solubles en metanol tuvo un efecto antagónico reversible del 30 % sobre la respuesta rápida.

La fracción en hexano tuvo un efecto antagónico irreversible del 60 % sobre la respuesta lenta. Sobre la respuesta rápida no mostró efecto.

Los alcaloides presentes en el extracto en hexano fueron: erithralina y a la 8-oxo-erithralina, con trazas de erisodina y cristamidina.

El antagonista DH β E mostró un efecto modulador positivo alostérico en presencia de la fracción en hexano y acetilcolina.

X. LITERATURA CITADA

- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiology Review*, 89(1), 73–120.
<http://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008.Mammalian>
- Alcaraz, R. V. M. (2001). *Estructura y Función del Sistema Nervioso: Recepción sensorial y estados del organismo* (2 edición). Guadalajara, Jalisco.
- Alkondon, M., & Albuquerque, E. X. (2001). Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ subtypes differentially control GABAergic input to CA1 neurons in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.*, 86, 3043–3055.
- Alkondon, M., & Albuquerque, E. X. (2004). The nicotinic acetylcholine receptor subtypes and their function in the hippocampus and cerebral cortex. *Progress in Brain Research*, 145, 109–120. [http://doi.org/10.1016/S0079-6123\(03\)45007-3](http://doi.org/10.1016/S0079-6123(03)45007-3)
- Araújo-Júnior, J. X. De, Oliveira, M. S. G. De, Aquino, P. G. V, Alexandre-Moreira, M. S., & Ana, A. E. G. S. (2012). A phytochemical and ethnopharmacological review of the genus *Erythrina*. In *Intech* (Vol. 1, pp. 327–352).
- Arnáiz, C. J. J. (2008). Regulación de la neurotransmisión por receptores nicotínicos. Madrid, España.
- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología Serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119–145. Retrieved from <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/viewFile/798/814>
- Barrett, K. E., Barman, S. M., Boitano, S., & Brooks, H. L. (2010). *Fisiología médica*. (McGraw-Hill, Ed.) *Nature* (Vigésimo t, Vol. 447). Ciudad de México.
- Biser, J. (1998). Really wild remedies—medicinal plant use by animals. *Smithsonian National Zoological Park*, 1–6. Retrieved from [http://westerlymsscience.pbworks.com/f/Really Wild Remedies-Medicinal Plant Use by Animals - National Zoo FONZ.pdf](http://westerlymsscience.pbworks.com/f/Really+Wild+Remedies-Medicinal+Plant+Use+by+Animals+-+National+Zoo+FONZ.pdf)
- Brejč, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V, Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, a B., & Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*,

- 411(6835), 269–276. <http://doi.org/10.1038/35077011>
- Buhler, a V, & Dunwiddie, T. V. (2001). Regulation of the activity of hippocampal *stratum oriens* interneurons by alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *Neuroscience*, 106(1), 55–67. [http://doi.org/10.1016/S0306-4522\(01\)00257-3](http://doi.org/10.1016/S0306-4522(01)00257-3)
- Bunalema, L., Kirimuhuzya, C., Tabuti, J. R. S., Waako, P., Magadula, J. J., Otieno, N., ... Okemo, P. (2012). The efficacy of the crude root bark extracts of *Erythrina abyssinica* on rifampicin resistant mycobacterium tuberculosis. *African Health Sciences*, 11(4), 587–593.
- Calderón de Rzedowski, G., & Rzedowski, J. (2005). *Flora Fanerogámica del Valle de México* (2 Edición). Michoacan, México: Instituto de Ecología A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Cano, J. F., Fierro-Urresta, M., Vanegas, C. R., Alzate, M., Olarte, A., Cendales, R., & Córdoba, R. N. (2007). Factores Pronósticos de Esquizofrenia en Primer Episodio Psicótico. *Revista de Salud Pública*, 9(3), 455–464. <http://doi.org/10.1590/S0124-00642007000300014>
- Chen, K., Nakauchi, S., Su, H., Tanimoto, S., & Sumikawa, K. (2016). Early postnatal nicotine exposure disrupts the $\alpha 2^*$ nicotinic acetylcholine receptor-mediated control of oriens-lacunosum moleculare cells during adolescence in rats. *Neuropharmacology*, 101, 57–67. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.09.022>
- Constanzo, L. S. (2011). *Fisiología*. (S. L. Elsevier España, Ed.) (cuarta, Vol. 53). Barcelona, España. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Daly, J. W. (2005). Nicotinic agonists, antagonists, and modulators from natural sources. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(3-4), 513–552. <http://doi.org/10.1007/s10571-005-3968-4>
- Dantas, M. C., De Oliveira, F. S., Bandeira, S. M., Batista, J. S., Silva, C. D., Alves, P. B., ... Marchioro, M. (2004). Central nervous system effects of the crude extract of *Erythrina velutina* on rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(1), 129–133. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.007>
- Djiogue, S., Halabalaki, M., Njamen, D., Kretschmar, G., Lambrinidis, G., Hoepfing, J., ... Vollmer, G. (2014). Erythroidine alkaloids : A Novel class of phytoestrogens. *Planta Medica*, 80, 861–869.

- Evans, W. C. (2009). *Alkaloids. Trease and Evans' Pharmacognosy*. Retrieved from http://www.us.elsevierhealth.com/media/us/samplechapters/9780702029332/9780702029332_2.pdf
- García-Mateos, R., Soto-Hernández, M., & Vibrans, H. (2001). *Erythrina americana* Miller ("Colorín"; Fabaceae), a versatile resource from Mexico: A Review. *Economic Botany*, 55(3), 391–400. <http://doi.org/10.1007/BF02866562>
- Garín, A. M. E., López, V. S., Martínez, V. C. L., Valencia, D. T. G., Soto, H. R. M., & Prado, A. R. A. (2009). Erisodina Y Receptores Nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ Del Hipocampo Dorsal En La Consolidación De La Memoria. *Revista Latinoamericana de Química*, 4(55), 206–217.
- Gotti, C., Zoli, M., & Clementi, F. (2006). Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27(9), 482–491. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2006.07.004>
- Govindarajan, M., & Sivakumar, R. (2014). Laboratory evaluation of Indian medicinal plants as repellents against malaria, dengue, and filariasis vector mosquitoes. *Parasitology Research*, 114(2), 601–612. <http://doi.org/10.1007/s00436-014-4222-0>
- Griguoli, M., Scuri, R., Ragozzino, D., & Cherubini, E. (2009). Activation of nicotinic acetylcholine receptors enhances a slow calcium-dependent potassium conductance and reduces the firing of *stratum oriens* interneurons. *European Journal of Neuroscience*, 30(6), 1011–1022. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06914.x>
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 391(2), 85–100. <http://doi.org/10.1007/BF00656997>
- Hansen, S. B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., & Bourne, Y. (2005). Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations, (September), 3635–3646. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600828>
- Hastings, R. B. (1990). Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, papilionoideae,

- part one. *Economic Botany*, 44(3), 336–348.
<http://doi.org/10.1007/BF03183915>
- Hogg, R., & Bertrand, D. (2004). What genes tell us about nicotine addiction. *Science(Washington)*, 306(5698), 983–984.
<http://doi.org/10.1126/science.1106030>
- Iturriaga-Vasquez, P., Carbone, A., García-Beltran, O., Livingstone, P. D., Biggin, P. C., Cassels, B. K., ... Bermudez, I. (2010). Molecular Determinants for Competitive Inhibition of $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology*, 78(3), 366–375. <http://doi.org/10.1124/mol.110.065490>.
- Jia, Y., Yamazaki, Y., Nakauchi, S., Ito, K.-I., & Sumikawa, K. (2010). Nicotine facilitates LTP induction in oriens-lacunosum moleculare cells via Ca^{2+} entry through non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Neuroscience*, 31(3), 463–476. <http://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010>.Use
- Jia, Y., Yamazaki, Y., Nakauchi, S., & Sumikawa, K. (2009). $\alpha 2$ nicotine receptors function as a molecular switch to continuously excite a subset of interneurons in rat hippocampal circuits. *European Journal of Neuroscience*, 29(8), 1588–1603. <http://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010>.Use
- Jones, S., Sudweeks, S., & Yakel, J. L. (1999). Nicotinic receptors in the brain: Correlating physiology with function. *Trends in Neurosciences*, 22(12), 555–561. [http://doi.org/10.1016/S0166-2236\(99\)01471-X](http://doi.org/10.1016/S0166-2236(99)01471-X)
- Kanno, T., Yaguchi, T., Yamamoto, S., Nagata, T., Yamamoto, H., Fujikawa, H., & Nishizaki, T. (2005). Bidirectional regulations for glutamate and GABA release in the hippocampus by $\alpha 7$ and non- $\alpha 7$ ACh receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(2), 742–7. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.10.044>
- Khiroug, S. S., Khiroug, L., & Yakel, J. L. (2004). Rat nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 2\beta 2$ channels: comparison of functional properties with $\alpha 4\beta 2$ channels in *Xenopus* oocytes. *Neuroscience*, 124(4), 817–22. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.01.017>
- Kuri-Morales, P. A., González-Roldán, J. F., Hoy, M. J., & Cortés-Ramírez, M. (2006). Epidemiología del tabaquismo en México. *Salud Publica de Mexico*, 48(3 SUPPL. 1), 91–98. <http://doi.org/10.1590/S0036-36342006000700011>
- López, H. E., & Solís, H. (2012). Epilepsia del lóbulo temporal y las neuronas

- hipocampales de las áreas CA1 y CA3. *Revista de La Facultad de Medicina de La UNAM*, 16–25.
- Luján, R. (2004). Bases moleculares de la señalización neuronal. *Ciencia Al Día Internacional*, 5(2), 1–19.
- MacVaugh, R. (1987). *Leguminosae. Flora Novo-Galiciana*. Ann Arbor, Michigan.: The University of Michigan Press.
- Martinez Alfaro, M. A. (1984). Medicinal plants used in a Totonac community of the Sierra Norte de Puebla: Tuzamapan de Galeana, Puebla, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 11(2), 203–221.
- Matsubayashi, H., Amano, T., Seki, T., Sasa, M., & Sakai, N. (2004). Postsynaptic alpha4beta2 and alpha7 type nicotinic acetylcholine receptors contribute to the local and endogenous acetylcholine-mediated synaptic transmissions in nigral dopaminergic neurons. *Brain Research*, 1005(1-2), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.01.040>
- McQuiston, a R., & Madison, D. V. (1999). Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(8), 2887–2896.
- Mohammed, M. M. D., Ibrahim, N. A., Awad, N. E., Matloub, A. A., Mohamed-Ali, A. G., Barakat, E. E., ... Colla, P. L. (2012). Anti-HIV-1 and cytotoxicity of the alkaloids of *Erythrina abyssinica* Lam. growing in Sudan. *Natural Product Research*, 26(17), 1565–1575. <http://doi.org/10.1080/14786419.2011.573791>
- Molero, C. A., & Muñoz, N. J. E. (2005). Psicofarmacología de la nicotina y conducta adictiva. *Trastornos Adictivos*, 7(3), 137–152. [http://doi.org/10.1016/S1575-0973\(05\)74521-9](http://doi.org/10.1016/S1575-0973(05)74521-9)
- Monaco, A., Aliev, A. E., & Hilton, S. T. (2015). Intramolecular Acylal Cyclisation (IAC) as an Efficient Synthetic Strategy towards the Total Synthesis of *Erythrina* Alkaloid Derivatives. *Chemistry - A European Journal*, 21(40), 13909–13912. <http://doi.org/10.1002/chem.201502436>
- Morris, R., & Fillenz, M. (2003). *La ciencia del cerebro una introduccion para jovenes estudiantes. La Asociación Británica de Neurociencias*.
- Nasimolo, J., Kiama, S. G., Gathumbi, P. K., Makanya, A. N., & Kagira, J. M. (2014). *Erythrina abyssinica* prevents meningoencephalitis in chronic

- Trypanosoma brucei brucei mouse model. *Metabolic Brain Disease*, 29(2), 509–519. <http://doi.org/10.1007/s11011-014-9488-5>
- Nott, A., & Levin, E. D. (2006). Dorsal hippocampal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and memory. *Brain Research*, 1081(1), 72–78. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.01.052>
- Olivares, J. D., Juárez, E., & García, F. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, 15, 20–28. Retrieved from https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol15_num1/articulos/el_hipocampo.pdf
- Omosa, L. K., Midiwo, J. O., Masila, V. M., Gisacho, B. M., Munayi, R., Francisca-Kamakama, ... Efferth, T. (2016). Cytotoxicity of 91 Kenyan indigenous medicinal plants towards human CCRF-CEM leukemia cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 179, 177–196. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.028>
- Omwenga, E. O., Hensel, A., Shitandi, A., & Goycoolea, F. M. (2015). Ethnobotanical survey of traditionally used medicinal plants for infections of skin, gastrointestinal tract, urinary tract and the oral cavity in Borabu sub-county, Nyamira county, Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 508–514. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.032>
- Orta-Salazar, E., Cuellar-Lemus, C. a., Díaz-Cintra, S., & Feria-Velasco, a. I. (2014). Marcaje colinérgico en la corteza cerebral y el hipocampo en algunas especies animales y su relación con la enfermedad de Alzheimer. *Neurología*, 29(8), 497–503. <http://doi.org/10.1016/j.nrl.2012.10.007>
- Pankratov, Y., & Lalo, U. (2014). Calcium permeability of ligand-gated Ca^{2+} channels. *European Journal of Pharmacology*, 739(C), 60–73. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.11.017>
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. *Academic Press*, (1), 1–474. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Pérez-Hernández, J., Zaldívar-Machorro, V. J., Villanueva-Porras, D., Vega-Ávila, E., & Chavarría, A. (2016). A potential alternative against neurodegenerative diseases: Phytodrugs Jesús Pérez-H, 2016(Figure 1). <http://doi.org/10.1155/2016/8378613>

- Pino-Rodríguez, S., Prieto-González, S., Pérez-Rodríguez, M. E., & Molina-Torres, J. (2004). Género *Erythrina*: Fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 23(2), 252–258.
- San Miguel-Chavez, R., Soto-Hernandez, M., Terrazas, T., & Kite, G. (2006). Morphology and alkaloidal profile of the seedlings of *Erythrina americana* MILL. and *E. coralloides* A.DC. *Feddes Repertorium*, 117(3-4), 232–239. <http://doi.org/10.1002/fedr.200511099>
- Sánchez, H. S. G. (2000). *Estudio químico-biológico de los alcaloides de Erythrina americana Miller y Erythrina coralloides A.DC.* (Tesis de m). Colegio de postgraduados. México.
- Sarris, J., McIntyre, E., & Camfield, D. A. (2013). Plant-based medicines for anxiety disorders, part 1: A review of preclinical studies. *CNS Drugs*, 27(3), 207–219. <http://doi.org/10.1007/s40263-013-0044-3>
- SEMARNAT. (2010). NOM-059-ECOL-2010. *Diario Oficial*. Segunda seccion secretaria de medio ambiente y recursos naturales.
- Shakir, T., Coulibaly, A. Y., & Kehoe, P. G. (2013). An exploration of the potential mechanisms and translational potential of five medicinal plants for applications in Alzheimer's disease. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 2(2), 70–88. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3703121&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Son, J.-H., & Winzer-Serhan, U. H. (2006). Postnatal expression of alpha2 nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNA in developing cortex and hippocampus. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 32(2-4), 179–90. <http://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2006.09.001>
- Son, J.-H., & Winzer-Serhan, U. H. (2008). Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs in rat hippocampal GABAergic interneurons. *Journal of Comparative Neurology*, 511(2), 286–299. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>.Innate
- Soto-Hernández, R. M., García-Mateos, R., Miguel-Chávez, R. S., Kite, G., Martínez-Vázquez, M., & Ramos-Valdivia, A. C. (2012). *Erythrina*, a Potential Source of Chemicals from the Neotropics. In *Bioactive Compounds in Phytomedicine* (pp. 163–184). Retrieved from

- <http://www.intechopen.com/articles/show/title/Erythrina-a-potential-source-of-chemicals-from-the-neotropics>
- Souza, D. J. F. de, Rezkallah, I. D., Fiorini, M. A., Rieger, S. C., Faria, T. de J., Andrei, C. C., ... Barbosa, A. M. (2014). Antimicrobial activity of Brazilian plants of the genera Leguminosae and Myrtaceae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 8(28), 958–966. <http://doi.org/10.5897/JMPR2014.5385>
- Sudweeks, S. N., & Yakel, J. L. (2000). Functional and molecular characterization of neuronal nicotinic ACh receptors in rat CA1 hippocampal neurons. *The Journal of Physiology*, 527 Pt 3, 515–528. http://doi.org/PHY_0856 [pii]
- Tapper, A. R., McKinney, S. L., Nashmi, R., Schwarz, J., Deshpande, P., Labarca, C., ... Lester, H. a. (2004). Nicotine activation of alpha4* receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5698), 1029–32. <http://doi.org/10.1126/science.1099420>
- Tugume, P., Kakudidi, E. K., Buyinza, M., Namaalwa, J., Kamatenesi, M., Mucunguzi, P., & Kalema, J. (2016). Ethnobotanical survey of medicinal plant species used by communities around Mabira Central Forest Reserve , Uganda. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 1–28. <http://doi.org/10.1186/s13002-015-0077-4>
- Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 amstrongs resolution. *Journal of Molecular Biology*, 346(4), 967–989. <http://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.031>
- Vasconcelos, S. M. M., Lima, N. M., Sales, G. T. M., Cunha, G. M. A., Aguiar, L. M. V, Silveira, E. R., ... Viana, G. S. B. (2007). Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2), 271–274. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.023>
- Wang, J., Wang, Y., Wang, Y., Wang, R., Zhang, Y., Zhang, Q., & Lu, C. (2014). Contribution of alpha4beta2 nAChR in nicotine-induced intracellular calcium response and excitability of MSDB neurons. *Brain Research*, 1592, 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.018>
- Xie, A., Gao, J., Xu, L., & Meng, D. (2014). Shared mechanisms of neurodegeneration in alzheimer's disease and parkinson's disease. *BioMed Research International*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/648740>