



UNAM

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN  
INTRAHIPOCAMPAL DE ERISODINA SOBRE LA  
CONSOLIDACIÓN DE UNA TAREA DE EVITACIÓN  
INHIBITORIA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
BIÓLOGO**

**PRESENTA:  
SANDRA LÓPEZ VALERA**

Directora de Tesis: M. en C. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR



**IZTACALA**

**Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 2007.**

Tesis parcialmente financiada por el Proyecto de Investigación No. 42  
PAPCA 2007 FES-Iztacala y PAPIIT IN212906 DGAPA-UNAM.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

---

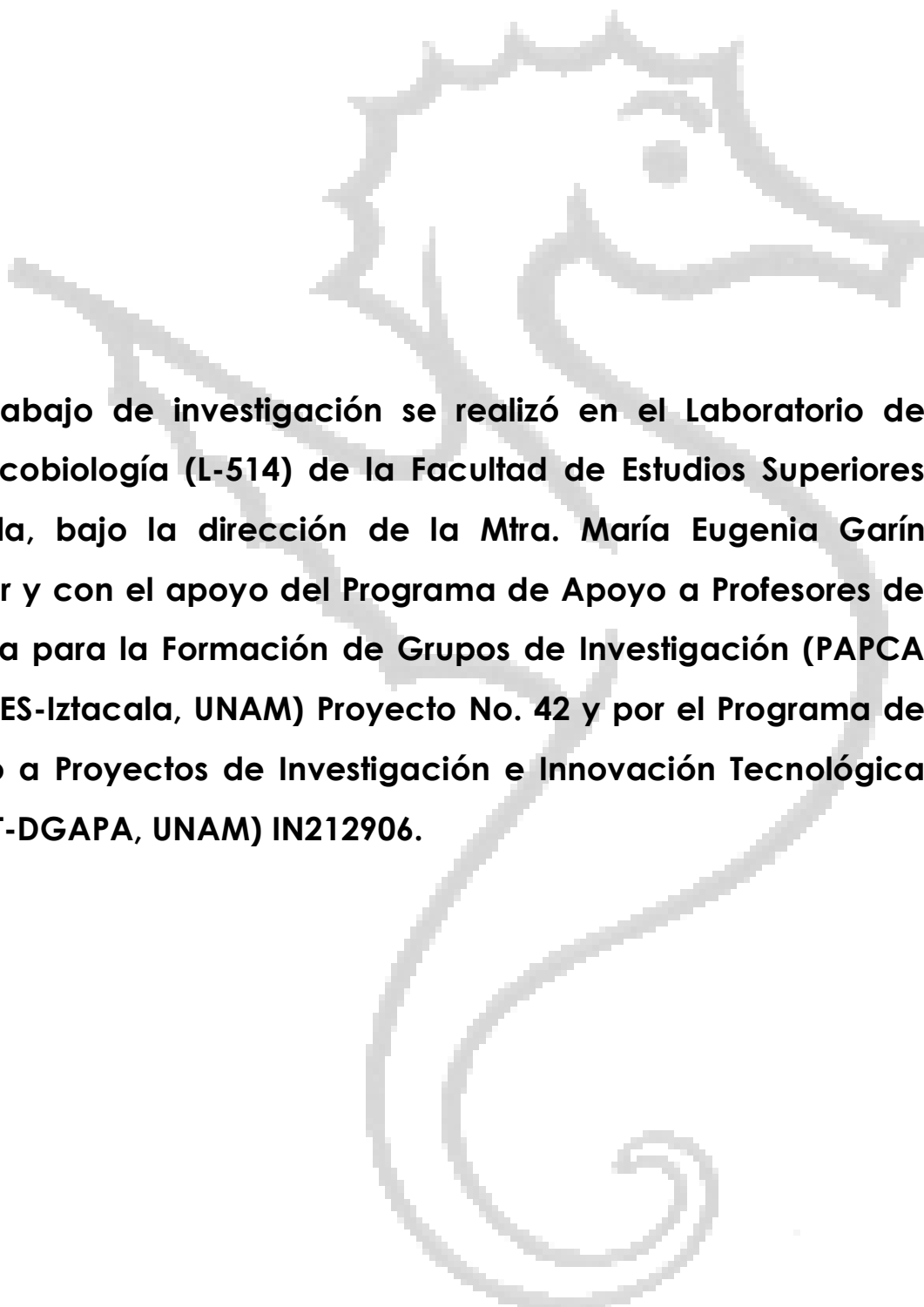
---

## **JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO</b>
<b>VOCAL</b>	<b>M. en C. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>M. en C. DAVID SEGURA COBOS</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>BIOL. MARCIAL GARCÍA PINEDA</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>M. en C. MARIA GRACIELA MOLINA GONZALEZ</b>

---

---



**Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacobiología (L-514) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la Mtra. María Eugenia Garín Aguilar y con el apoyo del Programa de Apoyo a Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA 2007 FES-Iztacala, UNAM) Proyecto No. 42 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM) IN212906.**

---

---

*Dedicatorias:*

*A mis papás Juana y Paulino ya que gracias a su paciencia, cariño y apoyo pude alcanzar una de mis metas que mas les agradezco y que a pesar de los obstáculos que a lo largo del tiempo tuvimos que enfrentar, nunca dejaron de confiar en mi. Gracias, los amo.*

*A mis hermanos Oscar, Perla, Leticia y Diego por ser mis compañeros de vida, con quienes a pesar de nuestras diferencias aprendimos a convivir y a saber que pase lo que pase, siempre seguiremos apoyándonos los unos a los otros.*

*A mis sobrinos Edgar y José Pablito por haberle dado a mi vida esa chispa que en dado momento necesitaba. Gracias por existir.*

*A mis cuñados José Pablo y Monse con quienes a pesar del poco tiempo de conocernos hemos aprendido a convivir por lo que les tengo mucho cariño. Gracias por los angelitos.*

*A Jesús Wong por ser un gran amigo y compañero, que gracias a ti muchas veces pude ver mis errores, además de ser un gran apoyo a lo largo de este trabajo.*

*A Tomas García por ser un gran amigo, que a pesar de que no estuvimos mucho tiempo en el mismo equipo, aprendí a conocer tu peculiar sentido del humor. Se te aprecia mucho.*

*A Edgar Morales por tener ese equilibrio entre la escuela y la diversión ya que con eso lograste que el equipo a veces se mantuviera y así sacar los proyectos (es a veces por que Wong También ayudo). Se te aprecia mucho.*

*A Gamaliel Omar por formar parte importante de la RAH la cual nos saco de muchísimos apuros. Además de enseñarnos el valor que los reptiles tienen. Se te aprecia mucho.*

*A Roberto Torres que por ser el más populachero lo que me ayudo conocerte desde antes de estar en el equipo y que gracias a eso convivimos mucho, Se te aprecia.*

*A mi equipo por que para mí, fue el mejor en el que pude haber estado. Gracias a todos los que lo formaron.*

---

---

## *Agradecimientos*

*A mi asesora María. Eugenia Garín por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio y que a pesar de las altas y bajas aprendí mucho emocionalmente como intelectualmente en el tiempo que estuve en el laboratorio. Gracias por su apoyo.*

*A mis sinodales, por sus atinadas observaciones ya que sin ellas no estaría completo este trabajo.*

*A mis Abuelitos Félix, Darío y Juana por demostrarnos con su peculiar forma de ser que nos quieren. Los queremos.*

*A mis tíos Moisés, Lucy, Salvador, Mane, Laureano y recién estrenada tía Fabiola por todo el cariño que le han dado a mi familia.*

*A mis Primos, Adriana, Moisés, Jimena, Javier y Manuel que a pesar de diferencia de edades, formamos un gran equipo. Los quiero mucho.*

*A Karyna Hdz por ser una gran compañera y estar estos 11 años conmigo. Gracias babas.*

*A Jacqueline Hdz por ayudarme en cierta etapa de mi vida y hacerme ver que debía de salir de mi caparazón.*

*A Héctor Hdz por ser como eres y de que a pesar de que no somos muy parecidos en cuanto a carácter aprendí a quererte mucho.*

*A Familia Hernández en general por considerarme parte su familia.*

*A la Facultad de Estudios Profesionales Iztacala, carrera de biología por darme la formación profesional que ahora culmina.*

*A todos los que no incluí por no querer que se me olvidara alguien, pero que estuvieron conmigo en este trabajo gracias por todo.*

---

---

## Contenido

Introducción	7
Antecedentes	9
Distribución geográfica del género <i>Erythrina</i>	9
Usos	11
Alcaloides de <i>Erythrina</i>	16
Acetilcolina	20
Receptores nicotínicos	24
Aprendizaje y memoria	27
El concepto de consolidación de la memoria	29
Participación del hipocampo en el proceso de aprendizaje y memoria	32
El Modelo de Evitación Inhibitoria	35
Estrategia farmacológica en el estudio del aprendizaje y la memoria	39
Materiales y Métodos	42
Diagrama de flujo	46
Resultados	47
Discusión	52
Conclusión	61
Sugerencias	61
Literatura citada	62
Anexo 1	67
Anexo 2	68
Anexo 3	70

---

---

## Resumen

Las plantas del género *Erythrina* son motivo de investigación debido a la presencia de una gran variedad de alcaloides en sus flores y semillas. En el laboratorio, los alcaloides erisodina y erisovina fueron aislados de semillas de *E. americana* y *E. herbacea* y resultaron ser los más abundantes en esta última especie. Estudios *in vitro* han revelado que la erisodina tiene una afinidad siete veces mayor a receptores acetilcolinérgicos nicotínicos  $\alpha_4\beta_2$  de tipo neuronal, con respecto al antagonista competitivo dihidro- $\beta$ -erythroidina; esto convierte a erisodina en una herramienta útil para la caracterización funcional de este subtipo de receptores en el cerebro. Debido a la presencia de estos receptores en el hipocampo y dado el papel que esta estructura tiene en el aprendizaje y memoria, este estudio se enfocó a determinar la participación de los receptores  $\alpha_4\beta_2$  del hipocampo dorsal del cerebro de rata en la consolidación de una tarea de evitación inhibitoria. Grupos independientes de ratas macho Wistar (n=10) se sometieron a cirugía estereotáxica para implantar cánulas dirigidas al hipocampo dorsal (AP = - 4.1, L  $\pm$  2.5, H = 3.1). Ocho días después de su recuperación las ratas se sometieron a un entrenamiento de evitación inhibitoria y justo cinco minutos después de recibida la experiencia se les administró 1, ó 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de erisodina para interferir con la consolidación de la memoria. Grupos adicionales recibieron 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de nicotina ó 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de dihidro- $\beta$ -erythroidina; al grupo control se le administró 1 $\mu\text{L}/\text{min}$  de solución salina al 0.9%. Veinticuatro horas después del entrenamiento se realizó la sesión de prueba. El análisis estadístico con Kruskal Wallis indicó que no hubo diferencias significativas en las latencias de adquisición, ni en las latencias de escape; las diferencias sólo se presentaron en las latencias de retención. La prueba post hoc U de Mann Whitney indicó que entre los grupos de nicotina y salina no hubo diferencias durante la retención, pero estos grupos fueron diferentes respecto de los grupos de animales que recibieron erisodina y dihidro- $\beta$ -erythroidina. La ausencia de diferencias en la adquisición y el escape sugiere que los animales desplegaron actividad similar ante la primera exposición a la cámara y presentaron la misma reactividad al choque eléctrico. Los resultados de este estudio aportan evidencia sobre la participación del sistema colinérgico neuronal del hipocampo dorsal en la consolidación de la memoria. Por otro lado, a pesar de que la administración post-entrenamiento de nicotina no deterioró la retención, no fue posible evidenciar, la ampliamente documentada, mejora en la consolidación, con la administración de este agonista colinérgico.



---

---

## INTRODUCCIÓN

El hombre ha hecho uso de los productos de la naturaleza desde tiempos inmemoriales, para alimentarse, sanar sus enfermedades, cicatrizar sus heridas y elevar su estado de ánimo. Aunque el uso de las hierbas con fines terapéuticos estaba asociada (y lo estuvo durante muchos siglos) a ritos mágicos y religiosos y su carácter curativo se atribuyó a las fuerzas divinas; cabe resaltar que esta utilización estaba basada por encima de todo en un buen conocimiento de la planta, adquirido empíricamente y transmitido de padres a hijos a través de muchas generaciones. Hasta el siglo XVIII se habían determinado las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y su forma de uso; pero se desconocía el motivo por el cual la planta actuaba de este modo, es decir, sus principios activos y su actividad fisiológica. El desarrollo científico y tecnológico permitió el reconocimiento y el aislamiento de los principios activos de muchas plantas medicinales (Sagrera, 1982). Tal es el caso del género *Erythrina* que en los años cuarenta tuvo mayor atención principalmente por la presencia de alcaloides que mostraban actividad curariforme. Varios alcaloides extraídos de plantas del género *Erythrina* fueron identificados con actividad curariforme incluyendo a la dihidro- $\beta$ -erythroidina (DHBE) la cual además de un efecto semejante al del curare, es un antagonista competitivo de receptores nicotínicos acetilcolinérgicos neuronales (Williams y Robinson, 1984). Sin embargo, estudios *in vitro* han revelado que la erisodina (otro alcaloide obtenido del género *Erythrina*) tiene una afinidad siete veces mayor a receptores acetilcolinérgicos nicotínicos de tipo neuronal subtipo  $\alpha_4\beta_2$  que la dihidro- $\beta$ -erythroidina (DHBE). Se ha sugerido que la activación de los

---

---

receptores nicotínicos  $\alpha_4\beta_2$ , que son predominantes en el sistema nervioso central, intervienen en los procesos de aprendizaje y memoria (López, 2003).

Desde el punto de vista neurobiológico, la memoria ha sido definida bajo dos categorías funcionales: La memoria de corto plazo y la de largo plazo. La conversión de la memoria de corto a la de largo plazo depende de un proceso hipotético denominado consolidación (Prado, et al., 2004). La función básica de la formación hipocampal parece ser la consolidación de la memoria a largo plazo a partir de la memoria inmediata y de corto plazo (Haines, 2003). El protocolo clásico para estudiar la consolidación es la prueba conductual de evitación inhibitoria; en esta tarea, una rata aprende a evitar un estímulo aversivo, la tarea no es única pero es preferida a muchos otros métodos de entrenamiento en los estudios de consolidación de la memoria (Gold, 1986).

Con las técnicas actuales y, la continua identificación y caracterización de subtipos de receptores acetilcolinérgicos neuronales en el sistema nervioso central se presenta una mayor posibilidad para descifrar los mecanismos que subyacen en el cerebro en cuanto a los procesos de memoria y aprendizaje así como, retos en términos del desarrollo terapéutico de blancos a estos receptores.

El hecho de que erisodina sea un potente antagonista competitivo a receptores acetilcolinérgicos nicotínicos neuronales subtipo  $\alpha_4\beta_2$ , hace de ella una herramienta importante para la caracterización funcional de estos receptores

---

nicotínicos en el hipocampo lo permitirá excluir la participación de otros subtipos de receptores nicotínicos en la consolidación de la memoria.

---

## ANTECEDENTES

### DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL GÉNERO *Erythrina*

El Género *Erythrina* (del griego *Erythros* que hace referencia al color rojo) pertenece a la subfamilia Papilionidae de la familia de las Leguminosas (Fabaceae) y consta de 113 especies de árboles, arbustos y hierbas, con inflorescencias y semillas rojas o anaranjadas, distribuidas en regiones tropicales y semitropicales del planeta (Musálem, 1992). De ellas, 31 especies corresponden a África, 12 a Asia y Oceanía y aproximadamente 70 se encuentran en el continente americano, de estas últimas se han identificado 27 para México (Neill, 1993), aunque existe la probabilidad de que hayan más especies sin identificar. Como se muestra en la figura 1 este género en México se encuentra distribuido en varios estados, entre los que destacan Puebla, Morelos, Guerrero, Chiapas, Tabasco, Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz, Estado de México y el Distrito Federal (Musálem, 1992).



Figura 1. Distribución del género *Erythrina* en México (Tomado de Musálem, 1992) destacando de color morado los estados de Puebla, Morelos, Guerrero, Chiapas, Tabasco, Oaxaca, San Luis Potosí, Veracruz, Estado de México y el Distrito Federal en donde se reportan algunas especies del género *Erythrina*.

---

## USOS

En diversos lugares de nuestro país este género tiene diferentes usos entre los que destacan:

**Agrícola:** Las cercas vivas son muy comunes en todos los países de América Central. Los árboles son utilizados para delimitar potreros, cafetales, zonas de cultivo y en general propiedades rurales (figura 2); en el caso de *Erythrina berteroana* y *Erythrina costaricensis* se ha señalado que estas especies fijan nitrógeno y sirven como forraje para ganado vacuno y caprino (figura 3) (Budowski, 2004).



Figura 2. Cercas hechas con árboles vivos utilizadas generalmente para delimitar terrenos (Imagen tomada de Virtual centre).



Figura 3. Algunas especies de *Erythrina* (*Erythrina fusca*) son utilizadas como forraje para ganado vacuno y caprino (Imagen tomada de FAO Corporate.org).

**Artesanal:** Con el tallo se manufacturan máscaras para el carnaval, y para la danza del tecuán en Olinalá (estado de Guerrero), las semillas se emplean para la elaboración de artesanías como collares y pulseras (figura 4); la corteza del árbol se utiliza como sustituto del corcho.



Figura 4. Algunas de las artesanías que se elaboran con semillas de *Erythrina* son pulseras y collares además de que la corteza obtenida de los árboles se emplean para la elaboración de mascarar (Fotografías de Garín-Aguilar).

---

**Comestible:** En San Luís Potosí las flores de *E. coralloides* y *E. americana* se consumen fritas o hervidas y como relleno en la preparación de tamales. En Colombia de las semillas de *E. edulis* se obtiene harina la cual es empleada en repostería debido al alto contenido de proteína que contiene (figura 5).



Figura 5. Arriba, diferentes platillos preparados con harina obtenida de semillas de *E. edulis* (Colombia) (Foto Soto-Hernández). Abajo, tamales preparados con inflorescencias de *E. americana* (Huejutla Hidalgo) (Foto Garín-Aguilar).

**Ornamental:** En las figuras 6 y 7 se muestra la belleza de las flores del genero *Erithryna* por lo que algunas de las especies son empleadas como adorno en



---

varios lugares; las especies arbóreas son comunes en jardines, banquetas y avenidas.



Figura 6. Flor de *Erythrina crista-galli* en donde se logra ver su belleza por lo que algunas especies son usadas como ornamentales (Imágenes tomadas de Treknature.com y pardeetree.com).



Figura 7. Frecuentemente se pueden encontrar árboles de *Erythrina* decorando calles y avenidas (Foto Garín-Aguilar).

**Medicinal empírico:** Algunos de los usos empíricos medicinales que se le han dado al género de *Erythrina* se describen continuación: en el estado de Veracruz las hojas de *E. Americana* frecuentemente son empleadas para curar

---

---

abscesos y úlceras, además de ser tomadas cuando hay enfermedades causadas por picaduras de mosquitos, en infusión se utilizan para aliviar las molestias de la erisipela (enfermedad causada por estreptococo), y como antipirético (baja la fiebre), hipnótico y sedante (SEMARNAP, 2004). En Guerrero la planta es utilizada contra la malaria (Rivera, 1943); los mayas huastecos del noreste de México utilizan la corteza hervida y es tomada como anticonceptivo 40 días después del parto (Hastings, 1990). En 1984, Alcorn indicó que en la zona huasteca, al noreste de México, los indígenas beben una infusión de las flores inmaduras de este vegetal para combatir el insomnio. Por otra parte, Morton, en 1994, reportó el mismo efecto para la inflorescencia de *Erythrina berteroana*. En Guatemala la decocción de un brote joven de *E. berteroana* es tomada como narcótico, la decocción de flores es sedativa, además de ser un remedio para los nervios y la disentería. Las ramas machacadas han sido usadas como veneno para peces (Morton 1981).

En Durango las semillas de *E. flabelliformis* es usada como remedio para el dolor de muelas y en mercados de Chihuahua la semilla es vendida como medicinal y quizás como anticonceptivo (Bye, 1986); los indios seris de Sonora usan hojas en té para curar la diarrea (Felger and Moser, 1974). Por lo que respecta a *E. herbacea* (Pemoche), en la región huasteca de San Luis Potosí, se asienta un grupo de mestizos y representantes de la etnia Tenek quienes indican el uso de esta planta, y semillas como un agente tranquilizante (Garín Aguilar, 2000).

---

---

Algunos de los efectos que empíricamente se han descrito para el género *Erythrina* pueden atribuirse a los alcaloides presentes en estas plantas ya que análisis químicos de las flores, hojas, corteza y semillas han mostrado la presencia de estos metabolitos con una gran variedad de estructuras químicas.

### **ALCALOIDES DE ERYTHRINA**

Desde 1930 se demostró la presencia de alcaloides en diferentes especies de *Erythrina*, se ha señalado que las semillas son estructuras vegetales en donde más se acumula estos metabolitos (cerca de 1%), aunque también como se indicó; estos se han logrado aislar de hojas, tallo, tronco, corteza, vainas, raíces y flores (García Mateos y Soto Hernández, 1998). Y fue hasta los años cuarenta que el género *Erythrina* tuvo mayor atención principalmente por la presencia de alcaloides que mostraron actividad curariforme.

Poseen estructuras moleculares complejas, con uno o varios anillos heterocíclicos como un pirrol, piridina, pirrolidina, quinolina o isoquinolina, pero ocasionalmente se encuentran del lado de una cadena alifática. Los alcaloides pueden presentarse como aminas derivadas teóricamente de amonio, la mayoría como aminas terciarias, ocasionalmente como aminas secundarias y, con menor frecuencia como compuestos cuaternarios (Maldoni, 1991).

Los alcaloides de *Erythrina* poseen un esqueleto base el cual se ha denominado eritriano, estructuralmente se trata de una espiroamina tetracíclica.

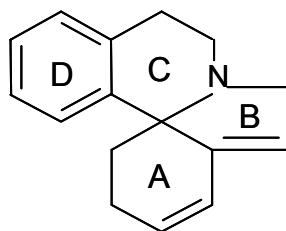


Figura 8. Esqueleto eritranano

Considerando las características del esqueleto, los alcaloides han sido clasificados en tres grupos:

1) **Diénicos**, contienen un sistema dieno conjugado en los anillos A y B.

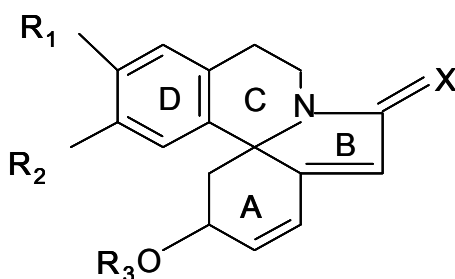


Figura 9. Estructura de los alcaloides Diénicos.

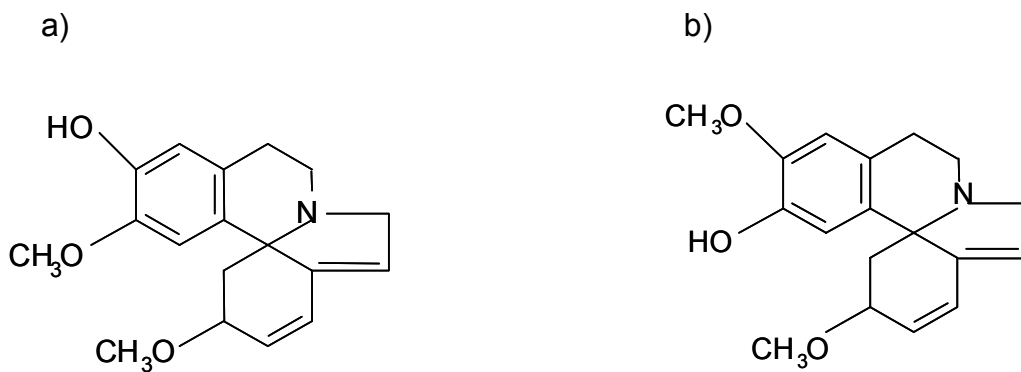


Figura 10. Ejemplo de alcaloides diénicos. a) Estructura de erisodina, b) Estructura de erisovina.

2) **Alquénicos**, presentan una insaturación 1-6 en el anillo A.

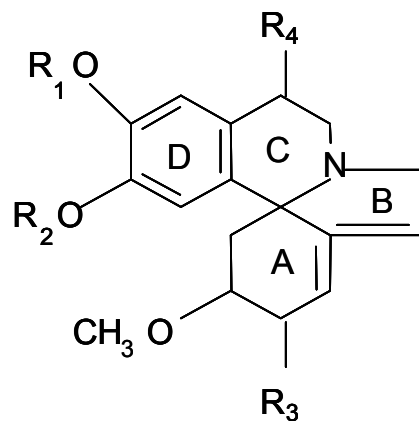
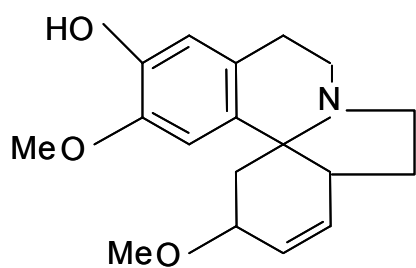


Figura 11. Estructura de los alcaloides Alquénicos.

a)



b)

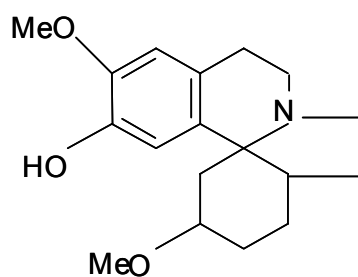


Figura 12. Ejemplo de alcaloides alquénicos. a) Dihydroerisodina, b) Dihydroerisovina.

**3) Lactónicos**, poseen una lactona cíclica en lugar de un anillo aromático D.

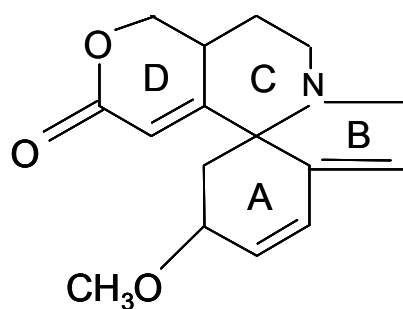


Figura 13. Estructura de los alcaloides lactónicos.

a)

b)



Figura 14. Ejemplo de alcaloides lactónicos. a)  $\alpha$ -eritroidina, b)  $\beta$ -eritroidina.

Algunos de los alcaloides que se han aislado son: erisovina, erisodina, erisotrina, eritralina, glucoerisopina erisotiovina,  $\alpha$  y  $\beta$  eritroidina, eritrocoraloidina, hipaforina, eritratina, eritramina, erisotiopina, coraloidina, etc. De los alcaloides erisotiovina,  $\alpha$  y  $\beta$  eritroidina se ha comprobado experimentalmente que tienen un efecto semejante al del curare (paralizante de los músculos esqueléticos e inhibidor en la transmisión de los impulsos nerviosos). Además de también haber detectado la presencia de una saponina no caracterizada que actúa dilatando la pupila y provocando trastornos visuales. En las hojas, el tallo, la raíz y los frutos se han detectado concentraciones bajas de ácido cianhídrico (Aguilar y Zolla, 1982).

Recientemente a partir del trabajo químico y farmacológico realizado en el laboratorio L-514 de la FESI, UNAM con especies del género *Erythrina* se observó que la administración de fracciones alcaloideas o del alcaloide  $\beta$ -erythroidina o su derivado dihidro- $\beta$ -erythroidina, disminuyeron la conducta agresiva de ratas (Garín-Aguilar et al., 2000; García-Mateos et al., 2000). Por otro lado, se ha señalado que además de un efecto semejante al del curare la

---

---

dihidro- $\beta$ -erythroidina (DH $\beta$ E) es un antagonista competitivo de receptores nicotínicos acetilcolinérgicos neuronales (Williams y Robinson, 1984) y estudios *in vitro* realizados por Decker et al. (1995a) mediante la técnica de membrana enriquecida mostraron que la erisodina tuvo siete veces más afinidad para el sitio de enlace nicotínico de alta afinidad que el alcaloide DH $\beta$ E. Este sitio parece corresponder al subtipo  $\alpha_4\beta_2$  del receptor acetilcolinérgico nicotínico (Flores et al., 1992; Whiting et al., 1992).

### **ACETILCOLINA (ACh)**

La acetilcolina es el principal neurotransmisor secretado por los axones eferentes del sistema nervioso central. Ya que la acetilcolina se encuentra también fuera del sistema nervioso central en localizaciones que son fáciles de estudiar, este neurotransmisor fue el primero en descubrirse, y ha recibido mucha atención de los neurocientíficos. En la figura 15 se muestra una visión esquemática sagital media del encéfalo de rata. En ella se indican los lugares más importantes de los cuerpos celulares colinérgicos y las regiones a las que llegan las ramas de sus axones. Las vesículas en la fase de liberación no se vacían totalmente, y un 15% de la sustancia permanece en la célula terminal (ACh estacionaria). La ACh que llega a la célula receptora se acopla a receptores específicos muscarínicos y nicotínicos. La activación del receptor muscarínico es rápida, mientras que la del nicotínico es más lenta y sostenida (Carlson, 2006).

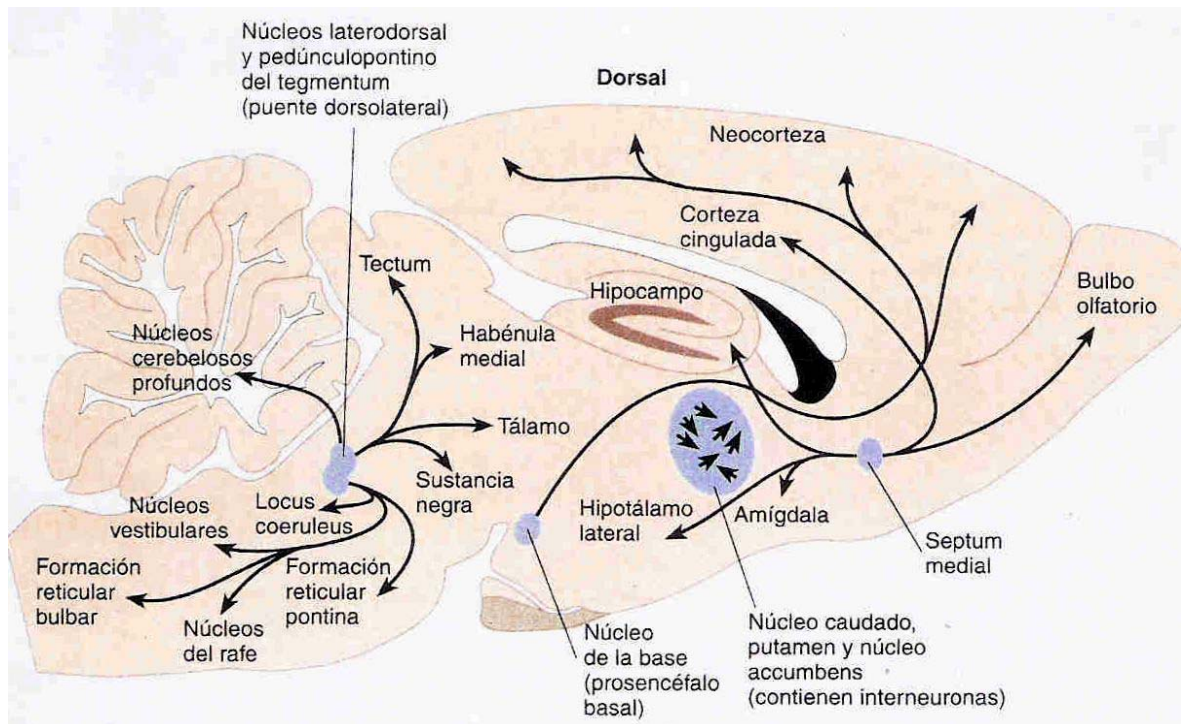
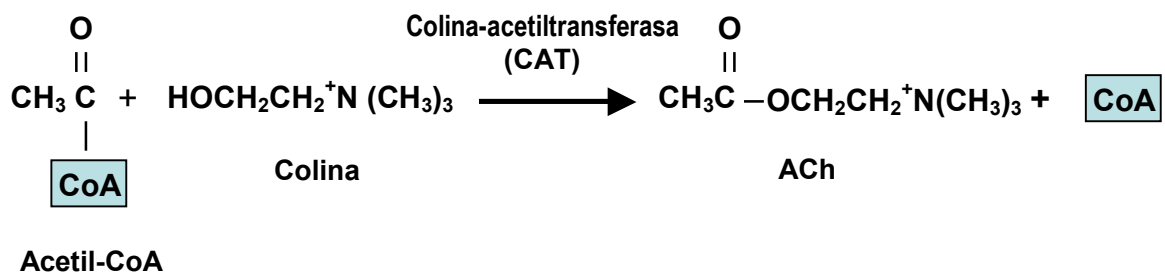


Figura 15. Esquema de una sección sagital media del encéfalo de rata, mostrando la localización de los principales grupos de neuronas colinérgicas y la distribución de sus axones y botones terminales (Modificado de Wolf, 1991).

La acetilcolina es sintetizada por la enzima colina-acetiltransferasa (CAT), que antes se denominaba acetilasa de colina, según la siguiente reacción:



En presencia de la enzima CAT, el ion acetato de la molécula de acetil CoA es transferido a la molécula de colina, produciendo una molécula de ACh y una de



---

---

la CoA simple. Durante la estimulación nerviosa, la ACh recién sintetizada puede ser liberada en forma preferente. Sin tomar en cuenta su fuente, la acetil CoA es sintetizada primariamente en las mitocondrias. La CAT al parecer se encuentra en el citoplasma sinaptosómico. La enzima colina-acetiltransferasa es activada por cloruros y es inhibida por reactivos sulfhidrido y puede utilizar varios derivados acilo tanto de la coenzima A como de la etanolamina como sustrato. Hay tres mecanismos para regular la concentración de ACh en las células: una inhibición retroactiva de ACh sobre la colina- acetiltransferasa, la acción de masas y la disponibilidad de acetil CoA, colina o ambas. De estas tres posibilidades el factor de regulación más importante es el transporte de colina de alta afinidad. Además, la concentración endógena de ACh también interviene en la regulación de la concentración del transmisor en el cerebro (Bowman & Rand, 1985; Carlson, 1994; Cooper, Bloom & Roth, 1996). Teóricamente, la producción de ACh guardaría relación directa con la concentración de colina. La ACh se almacena posteriormente en las vesículas sinápticas, de modo que al llegar el impulso nervioso, varios cientos de vesículas descargan simultáneamente el neurotransmisor hacia la hendidura sináptica.

Existe una gran cantidad de datos que indican que la acetilcolina (ACh), esta íntimamente relacionada con procesos de adquisición y consolidación de eventos aprendidos. La aplicación sistémica de drogas que bloquean los receptores colinérgicos cerebrales produce un espectacular cuadro amnésico, mientras que drogas que incrementan la liberación de acetilcolina revierten dicho cuadro e inducen una mejoría en la capacidad de retención. Estos datos

---

---

indican que algunas estructuras cerebrales cuyas neuronas producen ACh o reciben aferencias colinérgicas deben estar implicadas en procesos de memoria; tal es el caso de la corteza cerebral, la amígdala, el núcleo caudado o neostriado e hipocampo (Prado, et al., 1998).

Henry Dale (1914) observó que los diversos ésteres de colina desencadenaban reacciones semejantes a las de la nicotina o la muscarina, también observó una semejanza en la reacción entre la muscarina y la estimulación nerviosa en los órganos inervados por las divisiones craneosacras del sistema nervioso autónomo. Por tanto, Dale sugirió que la acetilcolina era un neurotransmisor en el sistema nervioso autónomo, también afirmó que el compuesto tenía acciones dobles, que denominó acción nicotínica y acción muscarínica. Aunque la acetilcolina y algunos otros compuestos pueden estimular a los receptores tanto muscarínicos como nicotínicos, hay un gran número de otros agonistas y antagonistas que son selectivos para uno de los dos tipos principales de receptor, lo cual pone de relieve sus diferentes propiedades (Hardman y Limbird. 2003). La diferencia entre estos dos tipos de receptores es que en el caso de los receptores muscarínicos pertenecen a la clase de los denominados receptores acoplados a proteínas G. Las reacciones de los agonistas, muscarínicos son más lentas, puede ser excitadoras o inhibitoras y no por fuerza se relacionan con cambios en la permeabilidad con iones. En contraste los receptores nicotínicos son canales iónicos con compuerta de ligando y su activación produce siempre un incremento rápido (milisegundos) de la permeabilidad celular al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{Ca}^+$ , despolarización y excitación (Hardman y Limbird. 2003).

---

## RECEPTORES NICOTÍNICOS

Desde hace mucho tiempo, con base en las acciones definidas de ciertos agonistas y antagonistas que interactúan con receptores nicotínicos del músculo estriado y los ganglios, se hizo evidente que no todos los receptores nicotínicos son idénticos. La heterogeneidad de este tipo de receptor resultó aún más clara a la luz de estudios de clonación molecular. Por ejemplo, el receptor nicotínico muscular contiene subunidades definidas en un complejo pentamérico ( $\alpha_2\beta\delta\gamma$  o  $\alpha_2\beta\delta\varepsilon$ ) (figura 16).

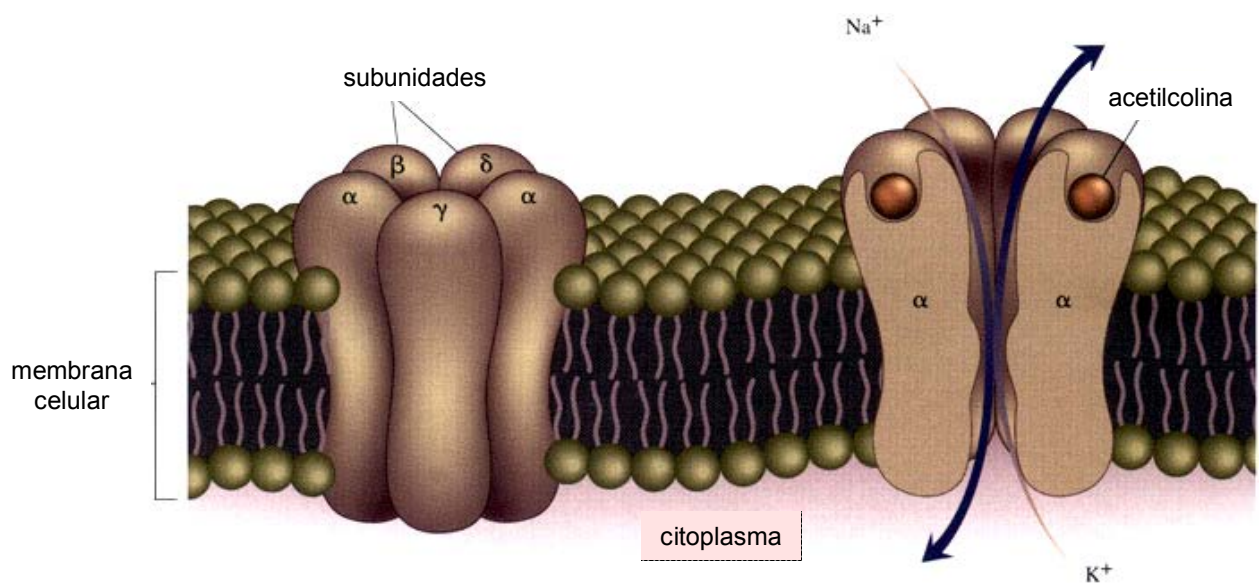


Figura 16. Representa su estructura del receptor nicotínico de Acetilcolina muscular en la membrana celular y flujo de iones a través del canal iónico. (Imagen tomada javeriana.edu.com).

Los receptores del músculo embrionario o desnervado contienen una subunidad  $\gamma$ , en tanto que hay una subunidad  $\varepsilon$  que sustituye a la  $\gamma$  en el músculo inervado del adulto. Este cambio de expresión en los genes que

---

---

codifican para las subunidades  $\gamma$  y  $\epsilon$  da lugar a pequeñas diferencias en la selectividad del ligando, pero el cambio puede ser más importante para el establecimiento de las tasas de recambio de los receptores o de la localización tisular (Hardman y Limbird. 2003).

Básicamente la estructura de los receptores nicotínicos del sistema nervioso periférico y central, llamados receptores nicotínico neuronales, se caracteriza por un anillo de cinco subunidades arregladas alrededor de un canal iónico excitatorio (Figura 17). Las subunidades neuronales nAChRs están clasificadas como  $\alpha$  ( $\alpha_2$  -  $\alpha_{10}$ ) y  $\beta$  ( $\beta_2$  -  $\beta_4$ ) (López, 2003). Aunque no todas las combinaciones de  $\alpha$  y  $\beta$  son funcionales, el número de permutaciones de  $\alpha$  y  $\beta$  que producen receptores funcionales es suficiente para impedir una clasificación farmacológica de todos los subtipo. Los pentámeros homoligoméricos de las subunidades  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$  y  $\alpha_9$  forman receptores funcionales (Hardman y Limbird. 2003). Así, las dos principales categorías neuronales que han sido identificadas sobre la base de su función y farmacología son: los llamados receptores neuronales heteropentaméricos, producto de la combinación de subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_2$ - $\alpha_6$ ) y  $\beta$  ( $\beta_2$ - $\beta_4$ ); y los llamados pentámeros homólogos (homopentámeros), formados por cinco subunidades  $\alpha$  idénticas (construidos de un solo tipo de subunidad,  $\alpha_7$ ,  $\alpha_8$  o  $\alpha_9$ ) (López, 2003). A la fecha, se han identificado 17 subunidades proteínicas, codificadas por diferentes genes.

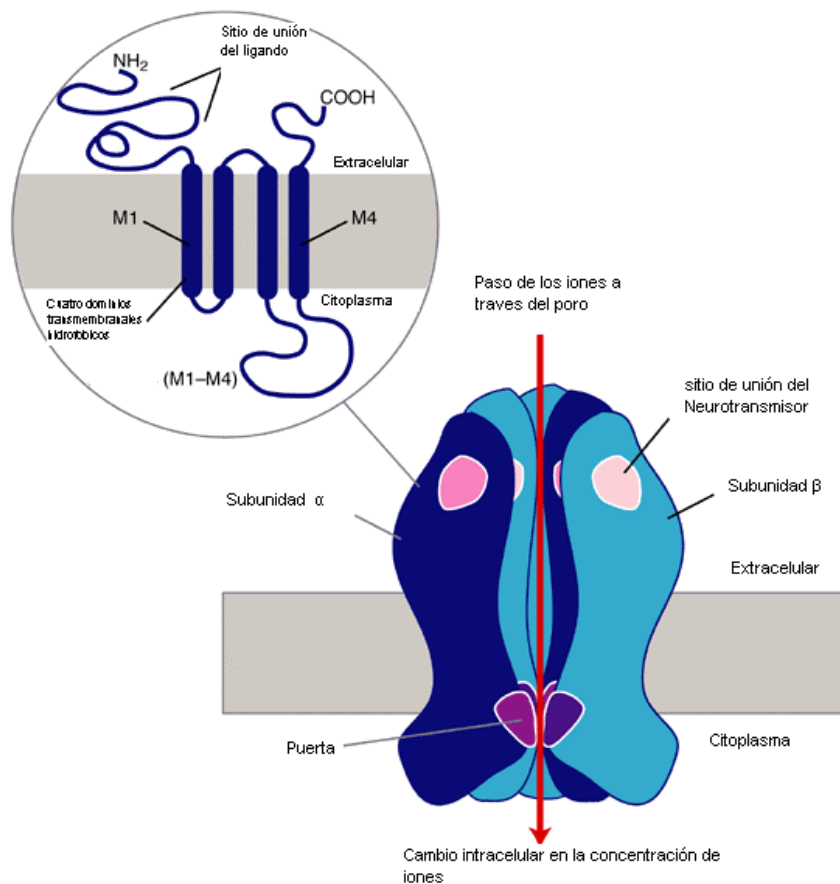


Figura 17. Representa la estructura del receptor nicotínico de Acetilcolina neuronal en la membrana celular, mostrando el sitio por donde hay un paso de iones, el sitio de unión con el neurotransmisor, además de mostrar los 4 dominios transmembranales. (Imagen tomada de wikipedia.org).

Cada subtipo de los receptores nicotínicos podría presentar una distribución regional, celular y subcelular distinta, lo cual podría contribuir a explicar la participación de los receptores nicotínicos en diferentes procesos fisiológicos y patológicos. Se conoce que los receptores nicotínicos están implicados en varias funciones cognitivas, el control de la actividad motora, la percepción sensorial, la depresión, la ansiedad, la atención, el aprendizaje, y la consolidación de la memoria. Se ha sugerido que la activación de los

---

---

receptores nicotínicos formados por  $\alpha_4\beta_2$ , que son predominantes en el sistema nervioso central, intervienen en los procesos de aprendizaje y memoria (López, 2003). Alkondon, et al., 1999, demostraron la presencia de receptores nicotínicos funcionales  $\alpha_7$  y  $\alpha_4\beta_2$  sobre interneuronas hipocampales CA1, siendo esta área un lugar en donde los receptores nicotínicos participan en la regulación de la memoria (Barros et al. 2004). Nott y Levin en el 2006 trabajaron en hipocampo dorsal utilizando nicotina (agonista de receptores colinérgicos), metilcaconitina (antagonista de receptores  $\alpha_7$ ) y Dihidro- $\beta$ -eritroidina (antagonista de receptores  $\alpha_4\beta_2$ ), confirmando con la administración de estas sustancias la importancia que tienen estos receptores nicotínicos en el hipocampo dorsal en la tarea de laberinto radial.

## **APRENDIZAJE Y MEMORIA**

Las definiciones de aprendizaje coinciden en que este proceso es un cambio en la conducta, relativamente permanente, que resulta de la experiencia. Mediante el aprendizaje se origina y mejora la ejecución a través de la experiencia. El cambio de la conducta no debe explicarse en términos de respuestas innatas, factores de motivación, adaptación sensorial; también se excluyen cambios de conducta que son el resultado de la maduración, la senectud o de variables fisiológicas o estados temporales como la fatiga, intoxicación, etc. (Bower & Hilgard, 1973; Kimble, 1969). El estudio del aprendizaje es por consiguiente, fundamental para la comprensión de los trastornos del comportamiento, así como la conducta normal (Kandel, 2001).

---

---

Desde el punto de vista neurobiológico, la memoria ha sido definida bajo dos categorías funcionales: La memoria de corto plazo y la de largo plazo. La primera es una memoria lábil, de poca capacidad y duración reducida, mientras que la segunda es relativamente permanente, de gran capacidad y resistente a la interferencia. Aunque no se conoce a ciencia cierta como se forman estas memorias, se manejan varias hipótesis al respecto; Una hipótesis relativamente antigua, pero que se ha mantenido vigente, acerca del establecimiento de la memoria de corto plazo asevera que este tipo de memoria depende de actividad reverberante en circuitos neuronales, inducida con la experiencia de aprendizaje. En esta memoria se guardan datos que son útiles durante periodos temporales cortos. Por otro lado, la memoria de largo plazo implica la producción de cambios plásticos relativamente duraderos. La memoria de largo plazo depende de que la información adquirida haya ocupado primero el pequeño almacén de corto plazo.

La conversión de la memoria de corto a la de largo plazo depende de un proceso hipotético denominado consolidación. La experiencia, adquisición de información o aprendizaje, se almacena brevemente en una memoria de corto plazo; si esta información es importante o si se repite con frecuencia, pasa a residir en el almacén de memoria de largo plazo. Esto último ocurre a través de la consolidación (Prado et al., 2004).

Observaciones clínicas similares representan el sustento de la hipótesis de la consolidación, que postula que la memoria se forma después de una

---

---

experiencia inicial, que al principio es frágil, y que con el transcurso del tiempo se estabiliza y se torna menos vulnerable a la interferencia (Prado et al., 2004). Las observaciones clínicas dieron lugar a observaciones controladas que confirieron a la consolidación un estatus de fenómeno susceptible al análisis experimental (De la Fuente, 1998).

### **EL CONCEPTO DE CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA**

Estrechamente relacionado a la noción de que pueda haber dos o más procesos diferentes de memorización se encuentra el concepto de la consolidación de la memoria, el cual, propone que una memoria se establece con más firmeza con el paso del tiempo, luego de la experiencia del aprendizaje (Kimble, 1982).

Müller y Pilzecker (1900) indicaron que si un sujeto memoriza una lista de palabras e inmediatamente después intenta aprender una segunda lista, la memoria de la primera lista tiende a desaparecer; el sujeto recordará mejor la primera lista si deja transcurrir uno o dos días antes de estudiar la segunda. Esta observación sencilla, contiene dos implicaciones de enorme importancia para cualquier teoría de la memoria: por una parte, la interferencia, en este caso de naturaleza retrograda, constituye un mecanismo fundamental del olvido; lo que aprendemos en cierto momento interfiere con la información que hemos recibido anteriormente; por otra parte, existe un periodo durante el cual la memoria es fácilmente alterable y sensible a la interferencia, tiempo en que el registro parece ser lábil; la estabilización de una huella de memoria exige



---

---

determinado lapso, y a este proceso de estabilización se denomina como consolidación (Ardila, 1979).

McDoougall 1901 proporcionó una explicación de la pérdida de la memoria retrograda vista después de traumatismos craneales. Varias décadas transcurrieron antes de completar la evidencia y así ser publicado. En un estudio se resumió un gran número de casos. En 1946 Rusell y Nathan reportaron que lesiones craneales producen amnesia retrograda en eventos ocurridos minutos, horas o días anteriores a la lesión. Duncan y Gerard en 1949 subsecuentemente reportaron la primera evidencia experimental induciendo amnesia retrograda: La cantidad de pérdida de memoria inducida por choques electroconvulsivos administrados a roedores después de una variedad de entrenamientos.

Por coincidencia, en 1949 fue también la fecha de dos publicaciones que proponían la hipótesis de la huella dual de la memoria. Hebb propuso que una huella inicial de corto plazo, basada sobre la reverberación neural, induce cambios neuronales, dando como resultado una memoria de largo plazo (McGaugh, 1999). Aunque la hipótesis de la huella dual es claramente una versión mas explícita de la hipótesis de consolidación y perseveración, Hebb no propuso el concepto de consolidación. El desarrollo de la hipótesis huella dual fue dirigida principalmente por conceptos neurofisiológicos de la reverberación neural. Estas contribuciones aumentaron el interés en la hipótesis de la consolidación. El hallazgo de Goddard en 1964, quien aplicó una estimulación eléctrica post-entrenamiento en la amígdala induciendo amnesia retrograda en

---

---

ratas estimuló investigaciones de sistemas cerebrales involucrados en la consolidación (McGaugh, 1999).

Los estudios de los efectos de la inhibición de la síntesis de proteínas fueron de particular significancia. Inhibidores de la síntesis de proteínas administrados a animales, después de ser entrenados, bloquearon la consolidación. Sin embargo la administración de estos inhibidores antes del entrenamiento también bloqueó la consolidación pero no bloqueó la adquisición. Lo que muestra que la memoria de corto y largo plazo fueron diferencialmente afectadas por el tratamiento (McGaugh, 1999).

De allí parte el supuesto sobre la existencia de mecanismos y formas diferentes de retención de información; e implica a su vez la existencia de un proceso nervioso activo que se mantiene después de que ha desaparecido la señal o estímulo presentado al organismo; es decir, la presentación de una señal inicia un proceso que se conserva aun después de la desaparición de la señal y que es responsable de los cambios morfológicos o fisiológicos permanentes que pueden aparecer en el sistema nervioso como consecuencia de la retención permanente de información. Tal proceso activo de fortalecimiento y estabilización de las huellas de memoria es la consolidación (Ardila, 1979).

---

---

## **PARTICIPACIÓN DEL HIPOCAMPO EN APRENDIZAJE Y MEMORIA**

El interés en el conocimiento de la participación del hipocampo en el aprendizaje y la memoria, se ha estimulado gracias a un individuo llamado H.M. (Brown, 1986). El estudio del ahora famoso paciente H.M., un varón de 27 años, que había sufrido durante 10 años crisis convulsivas como consecuencia de una lesión cerebral sufrida a los 9 años de edad al ser atropellado por alguien que circulaba en bicicleta. En la intervención quirúrgica se extirparon la formación del hipocampo, el núcleo amigdalino y partes del área de asociación multimodal de la corteza temporal en ambos lados. Las crisis convulsivas de H.M. se controlaron mucho mejor después de la cirugía, pero la extirpación de los lóbulos temporales mediales le dejó con un devastador déficit de memoria.

Este déficit de memoria (amnesia) era bastante específico. H.M. aún tenía una memoria a corto plazo normal, alrededor de unos segundos o minutos. Además tenía una memoria a largo plazo conservada para los acontecimientos que habían sucedido antes de la intervención. Recordaba su nombre y su oficio, y tenía recuerdos vívidos de la infancia, aunque mostraba algunos datos de amnesia retrógrada para la información adquirida en los años inmediatamente anteriores a la intervención. Lo que ahora le faltaba a H.M., y de manera llamativa, era la capacidad de transformar la nueva memoria a corto plazo en memoria de largo plazo. Era incapaz de retener más de un minuto de información sobre las personas, los lugares o los objetos, además de tener una grave dificultad en cuanto a la orientación espacial ya que le costó un año aprender el camino a una casa nueva, demostrándose por primera vez la notable función selectiva de ambos lóbulos temporales internos en convertir la

---

---

memoria acorto plazo en memoria de largo plazo. Los estudios neuroanatómicos y de fisiología celular en monos han ayudado a determinar que las áreas de asociación del lóbulo temporal interno, como la formación hipocampal, reciben información de casi todas las restantes áreas de asociación. Estas conexiones permiten que el hipocampo recoja todo el flujo de actividad cognitiva progresiva, y por lo tanto relacione diferentes aspectos de un único suceso de forma que pueda ser recordado como una experiencia coherente (Kandel, 2001). La función básica de la formación hipocampal parece ser la consolidación de la memoria a largo plazo a partir de la memoria inmediata y de corto plazo (Haines, 2003).

El hipocampo se encuentra subdividido en hipocampo dorsal e hipocampo ventral y se ha visto que estas regiones tienen algunas diferencias funcionales; lo que se atribuye al hipocampo dorsal es una mayor participación en el procesamiento de la memoria espacial, aunque hay estudios indicando la participación hipocampal en memorias no espaciales por ejemplo, conductas motivadas aversivamente como la respuesta de evitación inhibitoria en roedores, por ejemplo Lorenzini (1996) demostró, con la aplicación de tetrodotoxina (un Inactivador temporal aislado del pez globo) en el hipocampo dorsal, la implicación de esta estructura en la adquisición, consolidación y recuperación de la memoria. Ahora bien, el hipocampo ventral también es una región vital para la expresión del mejoramiento de la memoria ocasionado por nicotina, lesiones en esta área con ácido iboténico bloquean los efectos de mejoramiento de la memoria inducidos por tratamientos crónicos de nicotina, y

---

---

también bloquean los efectos sistémicos de la administración del antagonista mecamilamina (Levin et al., 2002).

Los trabajos de Lorenzini y colaboradores quienes inactivaron temporalmente el hipocampo dorsal (1996) o ventral (1997) con la administración de tetrodoxina (TTX), evidenciaron que la región ventral es crucial durante la adquisición, consolidación y recuperación de la respuesta de evitación pasiva. Por otra parte, la inactivación del hipocampo ventral antes de la recuperación de la información ocasionó una amnesia más marcada que la generada por la activación de hipocampo dorsal. Es decir, al parecer el hipocampo ventral tiene un papel más importante en la recuperación de la memoria de evitación pasiva que el hipocampo dorsal. Los resultados obtenidos durante la consolidación fueron totalmente diferentes, al parecer la integridad funcional del hipocampo ventral puede ser crítica durante periodos tempranos de la consolidación pues se observó que la administración de tetrodoxina 1.5 h después del ensayo de adquisición no afectó la memoria de la evitación pasiva, sin embargo, la administración de tetrodoxina (TTX) en el hipocampo dorsal, 1.5 h después del ensayo de entrenamiento provocó un deterioro significativo de la memoria. Lo que indica, que el tiempo de participación del hipocampo dorsal para la consolidación de la tarea es más amplio (Lorenzini, 1996).

---

---

Por lo tanto, todas estas investigaciones pueden tomarse como indicadores de una relativa independencia funcional del hipocampo dorsal y del hipocampo ventral, al menos en lo concerniente al condicionamiento de evitación inhibitoria.

### **EVITACION INHIBITORIA**

La evitación inhibitoria es un procedimiento usado frecuentemente para el estudio de efectos farmacológicos y otros tratamientos en aprendizaje y memoria. En una situación típica de evitación inhibitoria, una rata aprende a evitar un estímulo aversivo. La cámara de evitación inhibitoria (figura 18) ésta constituida por dos compartimentos con las mismas dimensiones (30X30X30cm) que se encuentran separados por una puerta corrediza tipo guillotina. El compartimiento de seguridad se encuentra iluminado con una lámpara de 10 W adherido a la tapa, y el piso lo forma una rejilla de barras de aluminio de 0.5 cm de diámetro, separadas por 1.5 cm de centro a centro. El compartimiento de castigo es oscuro y sus paredes laterales en forma de V son de acero inoxidable y se electrifican cuando las ratas entran en contacto con ambas paredes.

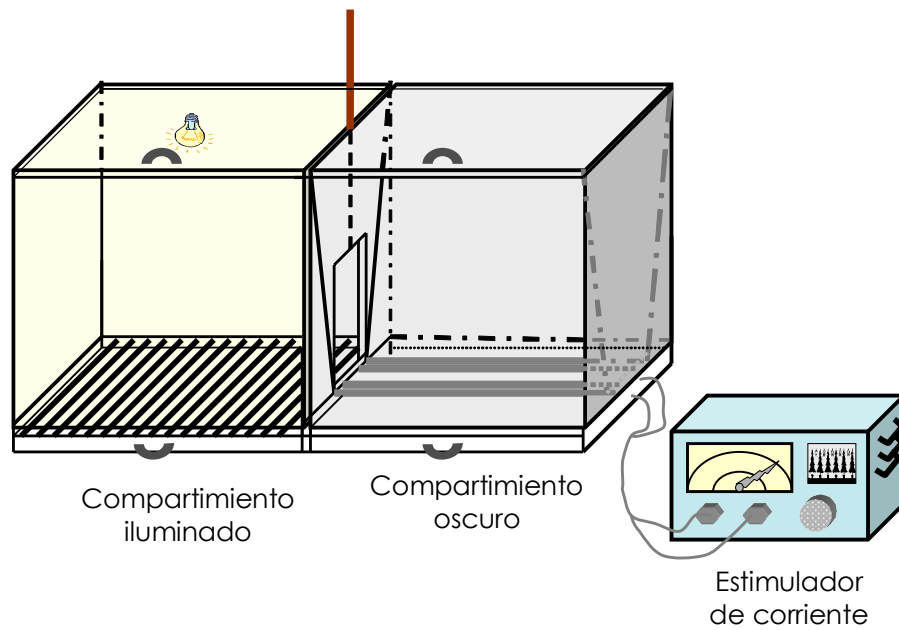


Figura 18. Cámara de evitación inhibitoria (Esquema, Prado-Alcalá).

El compartimiento de seguridad se encuentra iluminado con una lámpara de 10 W adherido a la tapa, y el piso lo forma una rejilla de barras de aluminio de 0.5 cm de diámetro, separadas por 1.5 cm de centro a centro. El compartimiento de castigo es oscuro y sus paredes laterales en forma de V son de acero inoxidable y se electrifican cuando las ratas entran en contacto con ambas paredes.

En el procedimiento de **evitación inhibitoria**, los sujetos son entrenados para evitar el estímulo aversivo por medio de la inhibición de una respuesta; generalmente se entrena a los sujetos a que eviten un choque eléctrico. El procedimiento consta de dos sesiones: durante la primera, también llamada de **entrenamiento** el animal se coloca en un compartimiento bien iluminado (lugar seguro de la cámara); poco tiempo después se abre una compuerta y se le

---

---

permite la entrada al compartimiento oscuro (de castigo) de la cámara donde se administrará el choque eléctrico inevitable ya que la compuerta de acceso se cerrará impidiendo que el animal se desplace al compartimiento seguro de la cámara. El tiempo que el animal tarda para cruzar del compartimiento seguro al de castigo durante esta sesión será la **latencia de adquisición**. En la otra sesión llamada de **prueba**, que generalmente se realiza a las veinticuatro horas procediendo de manera semejante que en la sesión de entrenamiento, excepto por la presentación del choque, se registra el tiempo que tarda el animal para cruzar del compartimiento seguro al de castigo; a este tiempo se le denomina **latencia de retención** (Gold, 1986).

Se esperaría que durante la sesión de entrenamiento el animal asocie el compartimiento oscuro con el choque de tal manera que colocándolo nuevamente en el compartimiento seguro de la cámara, evite recibir el choque inhibiendo la respuesta de entrada al compartimiento de castigo. La medida de retención usada en esta tarea es la latencia de la respuesta de entrada al compartimiento en donde recibieron el choque. Las latencias cortas son consideradas como evidencia de amnesia, y las latencias largas como evidencia de retención y aprendizaje. En la prueba de retención, si los sujetos permanecen en el compartimiento inicial por un período de tiempo arbitrario, se supone que retienen la respuesta, por lo tanto el criterio de retención debe ser lo suficientemente grande para poder asegurar que el efecto obtenido es el resultado de un proceso de retención (McGaugh, 1973).



---

---

Esta conducta de evitación inhibitoria implica que la rata almacenó en la memoria de largo plazo la experiencia aversiva. La duración del proceso de consolidación puede durar unos cuantos segundos o minutos, dependiendo de la intensidad del choque y agente amnésico estudiados (Prado, et al., 2004). En la tarea de evitación inhibitoria la memoria de corto plazo dura de 3-6 h, tiempo suficiente para que la memoria de largo plazo sea formada y pueda ser inhibido por muchos tratamientos (Izquierdo et al., 1998 a, b, c, 2002). La tarea de evitación inhibitoria presenta varias ventajas, la respuesta es aprendida rápidamente, la memoria es estable después de un periodo corto de entrenamiento y los resultados obtenidos son como los que se observan usando otras técnicas. La tarea de evitación inhibitoria no es única pero es preferida a muchos otros métodos de entrenamiento en los estudios de consolidación de la memoria (Gold, 1986).

Es indiscutible que el establecimiento de la memoria de largo plazo depende de la interacción de múltiples sistemas de neurotransmisores, que ejercen su acción en diversas estructuras cerebrales. Entre aquellos, los mas estudiados y de los que no hay duda acerca de su participación en la consolidación de la memoria están la acetilcolina (ACh) y la serotonina (5-HT) (Prado, et al., 2004). En el estudio de los procesos mnemónicos de aprendizaje y memoria se han generado dos grandes líneas de investigación: la primera pretende descubrir los mecanismos fisiológicos de los que depende el almacenamiento de la información, mientras que la segunda implica la determinación de las estructuras cerebrales encargadas de dicho almacenamiento. Actualmente algunos aspectos de los mecanismos neuronales que subyacen a varios tipos

---

---

de aprendizaje pueden estudiarse a nivel celular y molecular. El esclarecimiento de estos mecanismos es clave para llegar a comprender el desarrollo del carácter y la génesis de muchos problemas psicológicos y emocionales que son resultado de la experiencia.

El hecho de que varios procesos fisiológicos importantes parezcan ser regulados por uno o unos cuantos subtipos de receptores nicotínico neuronales hace posible dirigirse a funciones específicas sin afectar otros aspectos de la neurotransmisión colinérgica. Con las técnicas actuales y, la continua identificación y caracterización de subtipos de receptores acetilcolinérgicos neuronales en el sistema nervioso central se presenta una mayor posibilidad, así como, retos en términos del desarrollo terapéutico de blancos a estos receptores. Un subtipo de receptor neuronal, que se ha sugerido es importante e interviene en los procesos de aprendizaje y memoria, es el formado por las subunidades  $\alpha_4\beta_2$ ; y este subtipo de receptor es predominante en el cerebro por lo que se ha tratado de caracterizar su papel funcional (López, 2003).

## **ESTRATEGIA FARMACOLÓGICA EN EL ESTUDIO DEL APRENDIZAJE Y LA MEMORIA.**

Diversos enfoques y metodologías han sido empleados en la investigación del aprendizaje y la memoria. Entre ellas se encuentran las manipulaciones farmacológicas por ejemplo la administración de un fármaco que se puede realizar:

---

**a)** Cuando los estudios están orientados a observar la adquisición o el aprendizaje, los tratamientos se administran antes del entrenamiento (pre-entrenamiento), lo que altera el registro de la información permitiendo estudiar la adquisición y los procesos motores, motivacionales y perceptuales entre otros.

**b)** Cuando el punto de interés es la memoria o el mantenimiento de la respuesta, los tratamientos se administran después del entrenamiento (post-entrenamiento), entonces se puede estudiar la consolidación del aprendizaje.

**c)** Si la droga se administra antes de la prueba, entonces se estará evaluando el proceso de recuperación de la información (Kovács & De Wied, 1994; McGaugh, 1966; 1989b).

Actualmente se cuenta con fármacos de los cuales conoce su mecanismo de acción cuando modifican el funcionamiento del cerebro o de algunas estructuras (estriado, la amígdala y el hipocampo) relacionadas con el aprendizaje y memoria. Por ejemplo se ha reconocido el papel facilitatorio de la nicotina o el efecto de deterioro causado por el antagonista mecamilamina (Decker et al., 1995b; Barros et al., 2004); otra sustancia de reciente aplicación es la dihidro- $\beta$ -erythroidina (DH $\beta$ E) este alcaloide resultó ser un antagonista competitivo de receptores nicotínicos acetilcolinérgicos neuronales, pero que no es un antagonista específico a un solo subtipo de receptor, dado que se ha visto que se une tanto a receptores  $\alpha_4\beta_2$  así como  $\alpha_3\beta_2$  (Williams y Robinson,

---

---

1984; Nott y Levin, 2006) lo que hace mas difícil la tarea de caracterizar funcionalmente alguno de estos dos subtipos. Estudios *in vitro* realizados por Decker, et al., (1995a) mediante un método de membrana enriquecida, mostraron que erisodina tuvo siete veces más afinidad para el sitio de enlace nicotínico que dihidro- $\beta$ -eritroidina. Este sitio parece corresponder al subtipo  $\alpha_4\beta_2$  del receptor acetilcolinérgico nicotínico. Lo que convierte a erisodina una herramienta importante para la caracterización funcional de este subtipo de receptor nicotínico en el cerebro.

---

---

El hecho de que erisodina sea un potente antagonista competitivo a receptores acetilcolinérgicos nicotínicos de tipo neuronal subtipo  $\alpha_4\beta_2$ , hace de ella una herramienta importante para la caracterización funcional de estos receptores en el hipocampo, que dada su alta selectividad, permitirá excluir la participación de otros receptores nicotínicos en la consolidación de la memoria. Si en esa zona del hipocampo dorsal donde se administraron los fármacos, los receptores  $\alpha_4\beta_2$  participa de manera significativa en el proceso de consolidación de la memoria, la administración de erisodina producirá mayor deterioro en la retención, que la observada con la administración de antagonistas con menor afinidad a estos receptores. Por lo que el presente trabajo tuvo como **objetivo** determinar el efecto de la administración intrahipocampal (hipocampo dorsal) del antagonista colinérgico erisodina sobre la consolidación de una tarea de evitación inhibitoria.

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia metodológica en este tipo de estudios implica varias etapas entre las que destacan la cirugía estereotáxica, la evaluación conductual y el estudio histológico. En la figura 21 se muestra un esquema de estas fases, mismas que se describen a continuación:

**Sujetos.**- Se utilizaron ratas adulto macho del género *Rattus* de la especie *norvegicus* de la cepa Wistar (250-350 g), los cuales fueron proporcionados tanto por el bioterio de la FES-Iztacala como por el del Instituto de Neurobiología. Los animales fueron mantenidos en cajas individuales con un periodo de luz-oscuridad de 12 horas y libre acceso a comida y agua.

**Cirugía.**- Mediante cirugía estereotáxica y bajo anestesia general (pentobarbital 45 mg/Kg., i.p.) a los animales les fueron implantadas bilateralmente, dos cánulas que fueron dirigidas al hipocampo dorsal siguiendo las coordenadas AP= - 4.1, L  $\pm$  2.5, H=3.1 (Paxinos y Watson 1998). En la figura 19 se muestran algunos pasos a seguir durante una cirugía estereotáxica en donde se muestra, a) la colocación del sujeto en el estereotáxico, b) ubicación de puntos a perforar para la colocación de cánulas y c) colocación de cánula mediante guías. Y por último en la figura 20 se muestra en un esquema los puntos a donde deben de llegar las puntas cánulas en el área del hipocampo dorsal mediante las coordenadas de el atlas de Paxinos y Watson.

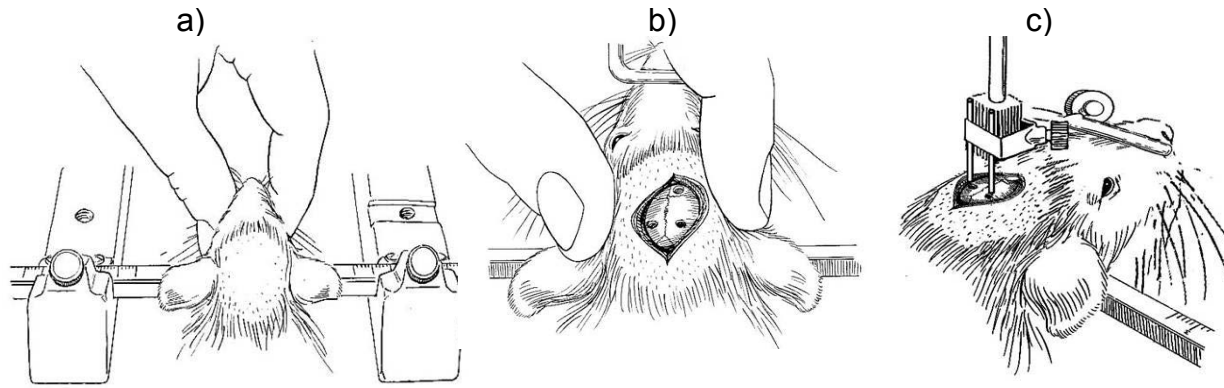


Figura 19. Se muestran algunas de las etapas para la implantación de cánulas durante la cirugía estereotáxica. a) Fijación de la cabeza del animal para mantener el cráneo en la posición adecuada, b) Perforación discreta del cráneo en función de coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson (1998), c) Colocación de cánulas para fijar con acrílico dental.

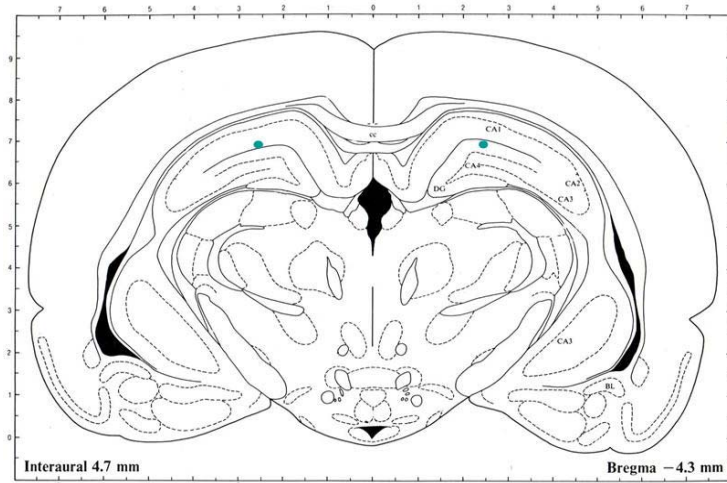


Figura 20. Los puntos azules indican la zona a donde se espera lleguen las puntas de las cánulas en el área de hipocampo dorsal (lámina del Atlas de Paxinos y Watson, 1998).

---

**Manipulación.**-Durante el transcurso de recuperación de la intervención quirúrgica, las ratas fueron manipuladas tres días; cada sesión, tuvo una duración de 5 minutos, durante este tiempo se trata al animal con suaves masajes en la nuca y en el lomo. El objetivo de está manipulación es que el animal se adapte o acostumbre al investigador. Una manipulación previa al entrenamiento se les introdujo, a través de las cánulas, un falso inyector; esto para que el día del entrenamiento la microinyección de la droga no fuera novedosa.

**Microinyección.**- Con ayuda de una microjeringa acoplada a una bomba de infusión continua (WPI modelo sp200i) se infundieron en el hipocampo dorsal de los sujetos (cada grupo fue conformado por 8 o 10 sujetos) las siguientes sustancias: erisodina (1.0 ó 2.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), o Dihidro- $\beta$ -eritroidina (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), o nicotina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y a un grupo control se le administró solución salina al 0.9% (en todos los casos la velocidad de infusión fue de 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ ). La microinyección se realizó cinco minutos después de que los animales fueron entrenados en la tarea de evitación inhibitoria.

**Entrenamiento y prueba.**- Ocho días después de la cirugía, los animales fueron sometidos a la sesión de entrenamiento en la cámara de evitación inhibitoria. El animal se colocó dentro del compartimiento iluminado. Transcurridos 10 segundos la puerta se abrió y se registró la latencia de entrada es decir el tiempo que tarda el animal de pasar del compartimiento iluminado al oscuro. Cuando esto ocurrió la puerta se cerró, y el animal recibió un choque eléctrico de 0.7mA en las patas durante 5 segundos. Posteriormente



---

---

la puerta se abrió y el animal escapó al compartimiento iluminado (latencia de escape), el sujeto permaneció allí 30 segundos antes de ser regresado a su caja habitación. La sesión de prueba se realizó 24 horas después, procediendo igual que en la sesión de entrenamiento, pero el choque fue omitido. El tiempo que el animal tardó en cruzar el compartimiento oscuro se tomó como evidencia de retención. Los animales que no cruzaron al lugar de choque en un tiempo de 600 s se regresaron a su caja y se dió por terminada la sesión.

**Perfusión.-** Una vez terminado el experimento conductual, todos los animales fueron sacrificados con una sobre dosis de pentobarbital sódico y perfundidos intracardialmente con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 10%. Una vez terminada la perfusión, se extrajo el cerebro y se colocó en un frasco con una solución de formaldehído al 10%.

**Histología.-** De los cerebros se realizaron cortes coronales de 50 micras de espesor siendo teñidos con la técnica de Nilss. Los cortes se observaron al microscopio y los animales cuyas cánulas no se encontraron en la estructura no fueron incluidos para el análisis estadístico (Ver anexo).

**Análisis estadístico.-** Los resultados de latencias de adquisición, escape y retención fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis y como prueba post hoc la de U-Mann Whitney ( $p < 0.05$ ).

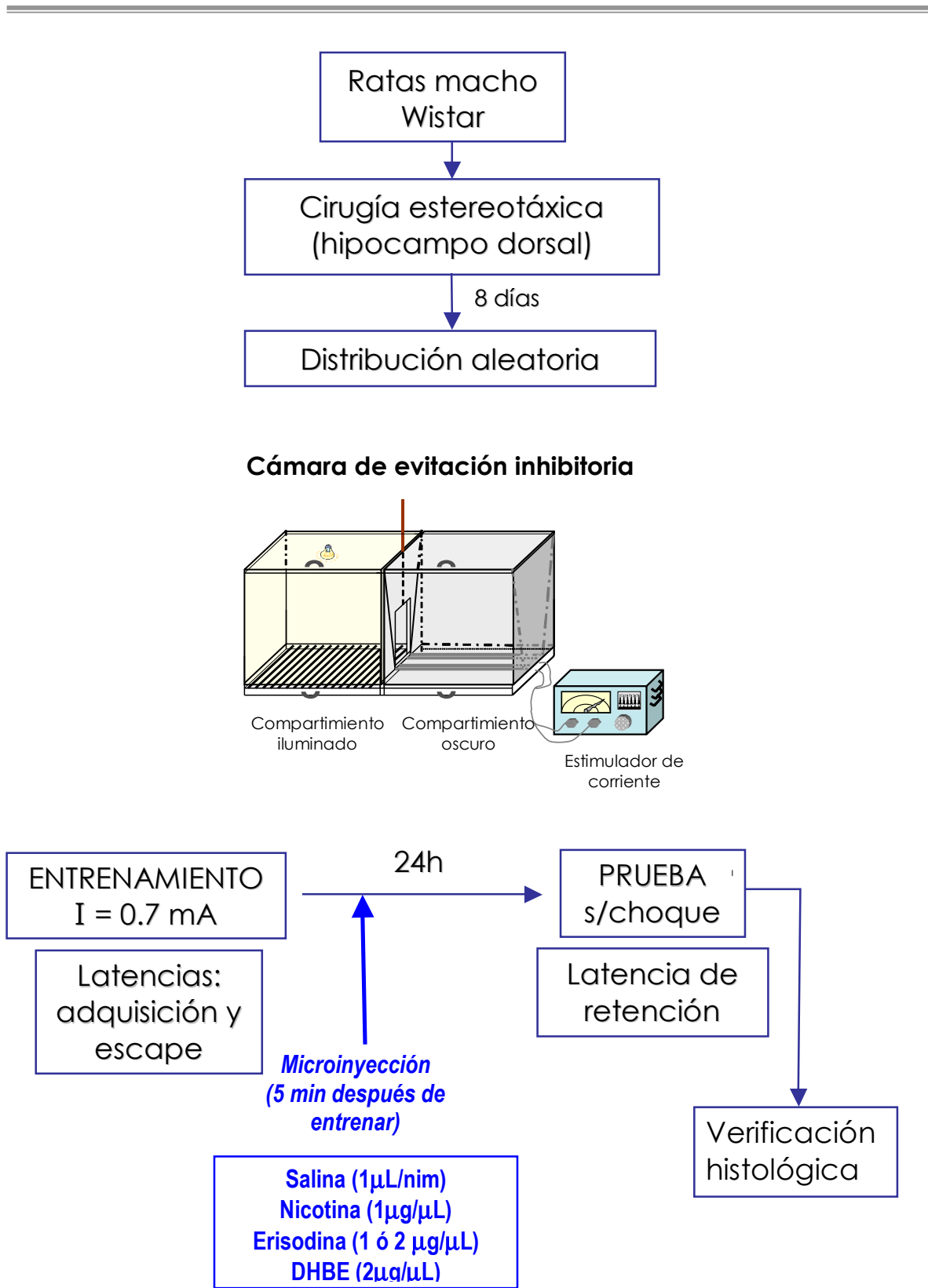


Figura 21. Diagrama de flujo que muestra la metodología que se siguió durante la realización del presente trabajo.

---

---

## RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestra la mediana de las latencias obtenidas con los datos derivados de los diferentes tratamientos administrados.

	Adquisición (s)	Escape (s)
Salina 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ (n=8)	16.01	1.69
Nicotina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n=8)	16.12	1.93
Erisodina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n=10)	15.98	1.88
Erisodina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n=10)	15.88	1.90
DHBE 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n=10)	15.97	1.52

Cuadro 1. Mediana de las latencias de adquisición y escape obtenidas durante el entrenamiento de evitación inhibitoria con un choque eléctrico de 0.7 mA. Los tratamientos nicotina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), erisodina (1 ó 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), dihidro- $\beta$ -eritroidina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) o salina (1  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) se administraron justo 5 minutos después del entrenamiento.

La prueba de Kruskal-Wallis indicó que durante la sesión de entrenamiento las **latencias de adquisición**, no presentaron diferencias  $H(4)=0.257$ ,  $p=0.992$ , lo que sugiere que los animales de los diferentes grupos desplegaron actividad similar ante la primera exposición a la cámara de evitación. Como tampoco hubo diferencias entre las **latencias de escape**  $H(4)=0.792$ ,  $p=0.940$ , por lo que podemos inferir que los animales de los diferentes grupos también presentaron la misma reactividad al choque eléctrico. Ver Figura 22.

## Evitación Inhibitoria (Entrenamiento)

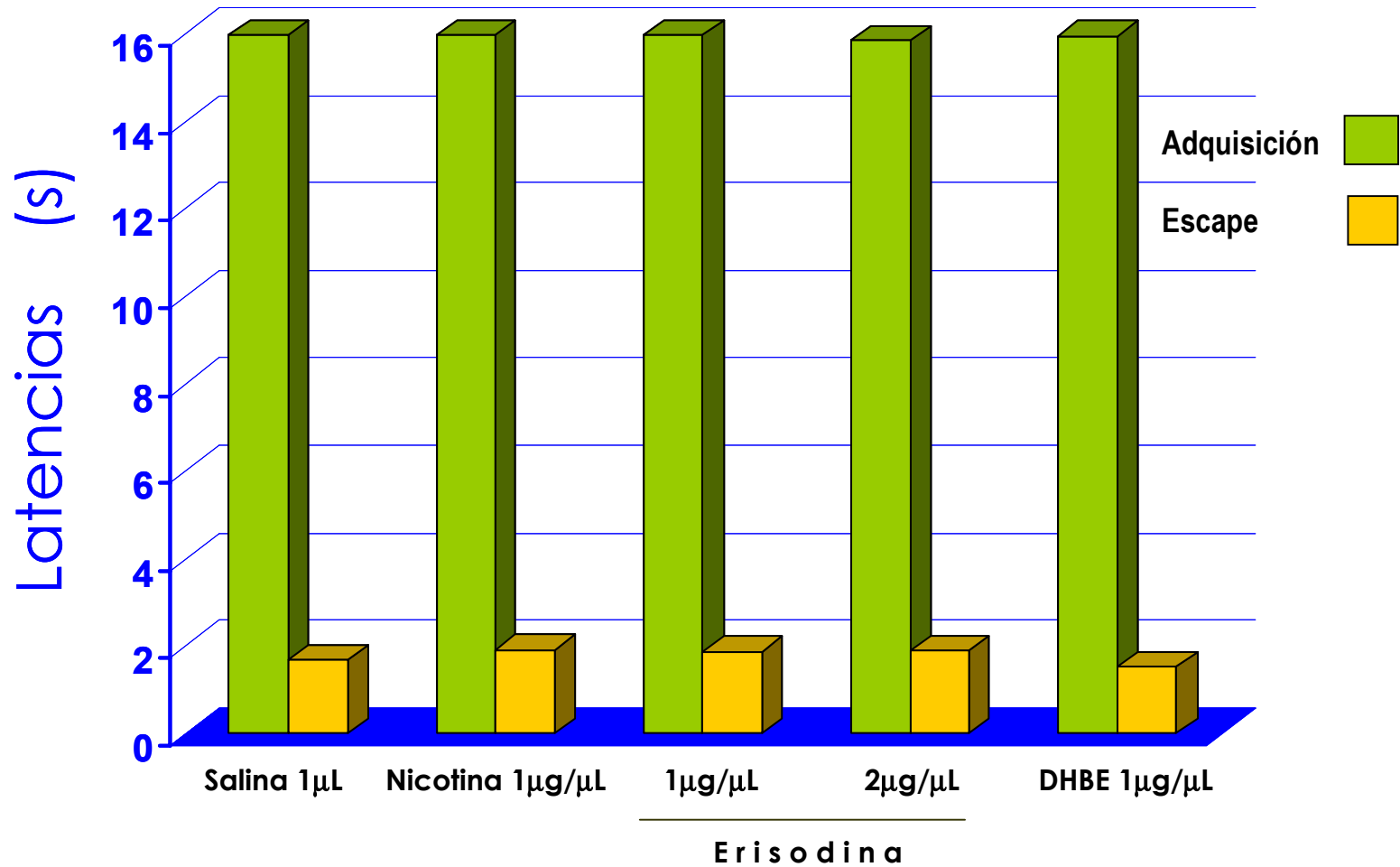


Figura 22. Mediana de las latencias de adquisición y escape. Se evidencia que los animales desplegaron una actividad normal durante su primera exposición a la cámara y una reactividad similar al choque eléctrico (sesión de adquisición).

---

---

Es importante resaltar que estos resultados no pueden ser explicados en términos de efecto de los tratamientos sobre la actividad motora o conducta exploratoria de los animales experimentales, ya que la administración de los fármacos se llevó a cabo justo 5 minutos después de realizado el entrenamiento de evitación inhibitoria y la prueba se realizó 24 horas después del entrenamiento, esto significa que cuando los animales se entrenaron o probaron, no se encontraban bajo el efecto del fármaco.

Por lo que respecta a las latencias de retención (cuadro 2 y figura 23), la prueba estadística de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en este parámetro  $H(4)=29.507$ ,  $p=0.0001$  y la prueba post-hoc U de Mann Whitney reveló que estas diferencias fueron significativas para los grupos que recibieron; erisodina  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p=0.001$ ), erisodina  $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p=0.001$ ) y Dihidro- $\beta$ -eritroidina  $2\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $p=0.0001$ ) con respecto al grupo control. También la prueba de U evidenció diferencias significativas entre los antagonistas con respecto al agonista nicotínico ( $p=0.0001$ ), ( $p=0.0001$ ), ( $p=0.0001$ ) respectivamente pero no se encontraron diferencias entre los antagonistas administrados (erisodina y dihidro- $\beta$ -eritroidina). Tampoco hubo diferencias entre el grupo control salina y el agonista nicotina. Por otro lado, podemos observar que a pesar de que el grupo que recibió nicotina después del entrenamiento alcanzó una mediana de 600 segundos en la latencia de retención, este valor no fue diferente de manera significativa al alcanzado por el grupo que recibió salina cuya mediana en la retención fue de 493.3 segundos.

---

---

	Retención (s)
Salina 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ (n=8)	493.3 <sup>a</sup>
Nicotina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n=8)	600 <sup>a</sup>
Erisodina 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n=10)	229.7 <sup>b</sup>
Erisodina 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n=10)	256.2 <sup>b</sup>
DHBE 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n=10)	180.6 <sup>b</sup>

---

Cuadro 2. Mediana de la retención de la tarea evaluada 24 horas después del entrenamiento de evitación inhibitoria. Las letras a, b representan los grupos formados al aplicar la prueba post-hoc de Mann Whitney.

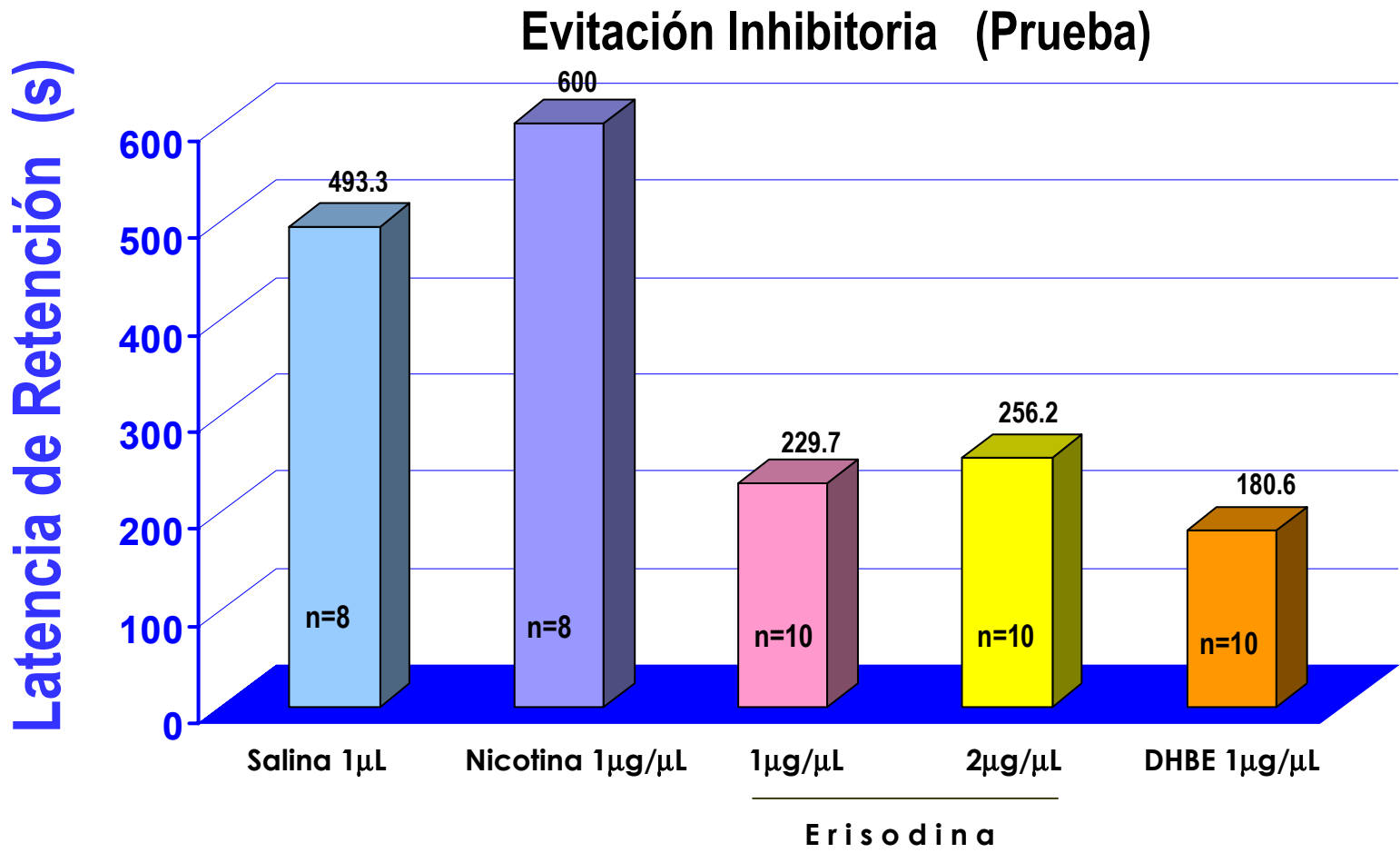


Figura 23. Mediana de la latencia de retención. Se observa que la administración de los antagonistas colinérgicos, Erisodina y DHBE en el hipocampo dorsal después del entrenamiento interfirió con la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria puesto que la retención fue significativamente menor a la alcanzada por el grupo de animales control que recibió NaCl 0.9%. El grupo que recibió Nicotina no presentó diferencias con respecto al grupo control.

---

En la figura 24 se muestra un corte coronal teñido con el método de Nissl, aquí se puede apreciar el sitio donde se ubicaron las puntas de las cánulas. Los datos conductuales de animales cuyos cortes de cerebro evidenciaron que las cánulas no se encontraron en el hipocampo dorsal, no fueron tomados en consideración para el análisis estadístico.

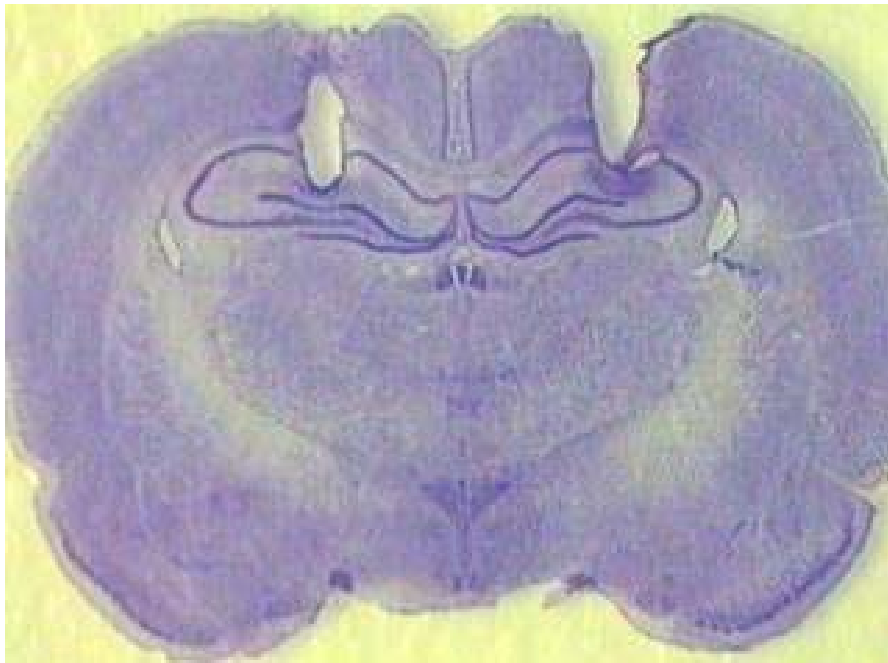


Figura 24. Corte coronal de un cerebro de rata mostrando el sitio de llegada de las puntas de las cánulas al hipocampo dorsal.

## **DISCUSIÓN**

Es evidente que los animales que conformaron los grupos empleados en este estudio recibieron de parte del experimentador, un manejo adecuado durante las tres sesiones consecutivas de manipulación, que se tuvieron previo a la sesión de entrenamiento de evitación inhibitoria, lo cual se vió reflejado en los valores de latencia de adquisición (no hubo diferencias entre los grupos), y en la forma en que los animales reaccionaron al choque eléctrico (latencias de escape), pues tampoco hubo diferencias en este parámetro. Esto significa que



---

el experimento se realizó con grupos de animales que reunían el requisito de ser homogéneos, atributo que es indispensable controlar en estudios conductuales.

Con respecto a nicotina, el efecto de mejoramiento producido por este agonista ha sido ampliamente documentado en modelos experimentales con animales y en estudios clínicos con humanos (Decker et al., 1995b; Brancroft y Levin, 2000). Se ha demostrado que la nicotina mejora el aprendizaje, la atención y la memoria de sujetos fumadores y no fumadores (Levin et al, 2006) y la capacidad de la memoria de roedores y primates no humanos aumenta con la administración de nicotina o de agonistas nicotínicos (Decker, 1995b). En otros estudios, se ha señalado que la nicotina mejora los procesos de adquisición, consolidación, y evocación de tareas como la evitación pasiva y el laberinto radial (Barros et al., 2004; Levin, 2002; Nott y Levin, 2006). Barros y colaboradores administraron una dosis de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de nicotina en el hipocampo dorsal, obteniendo una mejora en la consolidación de evitación inhibitoria.

Los resultados de nuestra investigación muestran que con la administración de esta misma dosis de  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de nicotina en el hipocampo dorsal, no se obtuvo el efecto de mejora en la memoria reportado en otros estudios, pues no hubo diferencias significativas entre el grupo de nicotina y el grupo control; pero hay que hacer notar que aunque no hay diferencias entre estos dos grupos, los animales del grupo control alcanzaron una retención de 493.3 segundos, mientras que los animales que recibieron el agonista nicotínico alcanzaron una retención de 600 segundos llegando así al valor de corte arbitrario; lo que deja

---

---

oculto un efecto facilitatorio si es que lo hubo con este agonista. La ausencia de diferencias entre salina y nicotina la podemos explicar de la siguiente manera: es probable que en las condiciones específicas de trabajo en el laboratorio, una mejora en la retención de la tarea de evitación inhibitoria por nicotina, requiera de una dosis más alta (superior a  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); pues es importante señalar que en la mayoría de los protocolos experimentales donde se presenta el efecto de mejora de la memoria por nicotina, la administración del agonista requirió ser crónica. Sin embargo, existe la posibilidad de probar si  $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$  nicotina es suficiente para mejorar la retención de la tarea realizando ahora el entrenamiento de evitación inhibitoria aplicando una intensidad de choque eléctrico menor a la utilizada en este estudio (0.7 mA). ¿Qué se espera con esto? Que durante la sesión de prueba (24 horas después del entrenamiento), los valores de retención del grupo que reciba nicotina no estén tan cerca del valor de corte arbitrario de 600 segundos lo que posiblemente permitirá observar el efecto de mejora de la nicotina, si es que este agonista lo ocasiona.

Como se indicó con anterioridad, el estudio de la participación de los receptores nicotínicos cerebrales en procesos fisiológicos, ha requerido del empleo de diferentes fármacos agonistas o antagonistas a esos receptores. Específicamente, mecamilamina, permitió examinar la participación de los receptores nicotínicos  $\alpha_3\beta_2$  en la adquisición, consolidación y evocación de memoria de corto y largo plazo de una tarea de evitación pasiva (Barros et al., 2004). Metilcaconitina (toxina aislada de semillas de *Delphinium browni*), es un antagonista selectivo a receptores  $\alpha_7$  y también ha permitido detectar la implicación de este receptor en la memoria de trabajo en laberinto radial de 8

---

---

brazos, administrando el antagonista 10 minutos antes de la prueba (Felix y Levin, 1997). Dihidro- $\beta$ -eritroidina (DHBE) que es un antagonista de receptores  $\alpha_4\beta_2$  permitió determinar, para una tarea de evitación inhibitoria, la participación de este receptor en: a) La adquisición, cuando el antagonista DHBE se administró 15 minutos antes del entrenamiento; b) La consolidación, cuando DHBE se administró inmediatamente después del entrenamiento y c) La evocación de memoria de corto y largo plazo, administrando DHBE 15 minutos antes de la sesión de prueba (Barros 2004).

Hasta el momento, la fisiología y participación del receptor  $\alpha_4\beta_2$  en los procesos mnemónicos, se ha venido determinado utilizando su antagonista competitivo DHBE un inconveniente de esto es que hay evidencias que indican que DHBE también se enlaza competitivamente a receptores heteroméricos neuronales que contienen subunidades  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$  y  $\beta_2$  (Dwoskin y Crooks, 2001; Williams y Robinson, 1984), actuando con especificidad sobre receptores  $\alpha_3\beta_2$  y presenta una afinidad mas baja al receptor  $\alpha_7$  (Sharples and Wonnacott, 2001). Por otro lado, utilizando un modelo de expresión heteróloga de receptores, se ha demostrado que ovocitos de *Xenopus* conteniendo receptores  $\alpha_4\beta_2$  son más sensibles a dihidro- $\beta$ -eritroidina que los ovocitos que expresaron receptores  $\alpha_3\beta_2$ ,  $\alpha_3\beta_4$  ó  $\alpha_2\beta_2$  (Luetje et al., 1991; Harvey y Luetje, 1996; Harvey et al., 1996), en el estudio se sugiere que actúa primero en la subunidad  $\alpha_4$  y probablemente al subtipo  $\alpha_4\beta_2$ . Aún cuando hasta el momento, no se cuente con antagonistas más selectivos, esos datos muestran que no es

---

---

posible excluir totalmente el papel de otros subtipos de receptores nicotínicos sobre una acción específica estudiada ya sea el efecto ansiolítico o los procesos de memoria y aprendizaje.

Como se ha señalado, erisodina alcaloide que hemos aislado en el laboratorio, a partir de semillas del género *Erythrina*, es un antagonista nicotínico que ha mostrado tener una afinidad a receptores nicotínicos  $\alpha_4\beta_2$  siete veces superior a la mostrada con DHBE (Decker, et al., 1995a), por lo que en este estudio, erisodina fue utilizada como una herramienta importante para la caracterización funcional de este subtipo de receptores nicotínicos en el hipocampo dorsal de rata. Específicamente durante esta investigación, los antagonistas erisodina o DHBE se administraron en el hipocampo dorsal y se evaluó el efecto que tienen sobre la consolidación de una tarea de evitación inhibitoria. Se esperaba que dada la mayor afinidad de erisodina a receptores  $\alpha_4\beta_2$ , con respecto a DHBE, la retención de la tarea presentara mayor deterioro con erisodina, que el observado con DHBE. Si embargo, en este estudio se evidenció que las dos sustancias interfirieron de forma semejante con este proceso, pues con 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de erisodina se obtuvo una mediana de 229.7 segundos, con 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de erisodina una mediana de 256.2 segundos y con dihidro- $\beta$ -eritroidina una mediana de 180.6 segundos, sin que se presentaran diferencias significativas entre ellas, para explicar estos resultados es necesario analizar las siguientes evidencias experimentales encontradas en la literatura.

---

---

La distribución de los receptores nicotínicos en el cerebro de rata se ha obtenido con estudios de enlace usando drogas nicotínicas radiactivas, técnicas de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Así se ha visto que el subtipo más abundante en el cerebro es el  $\alpha_4\beta_2$ , además de contener receptores  $\alpha_5$  y  $\alpha_3\beta_2$ , con o sin la presencia de  $\alpha_5$  están presentes no solo en ganglios autónomos sino también en la glándula pineal, el núcleo anteroventral del tálamo, el subículum del hipocampo, la espina dorsal y la retina. El receptor  $\alpha_7$  se encuentra ampliamente distribuido particularmente en el hipocampo, hipotálamo, corteza y núcleo motor del nervio vago (Gotti y Clementi, 2004). En el hipocampo dorsal se ha encontrado una concentración alta del subtipo  $\alpha_7$  (Fabian-Fine et al., 2001). En cuanto a los receptores  $\alpha_3\beta_2$ , estos se encuentran principalmente en las áreas mesocorticolímbicas (Mogg et al., 2002), y en bajas cantidades en el hipocampo dorsal (Curt y Clementi, 1995; Decker, et al., 1995b).

Ahora bien, ya se ha indicado que múltiples estudios han demostrado la implicación de los receptores  $\alpha_4\beta_2$  y  $\alpha_7$  en procesos cognitivos de memoria espacial (Nott y Levin, 2006), memoria de trabajo (Levin et al., 1997, 2002) y en la adquisición, consolidación y evocación de la memoria. Además de que el subtipo  $\alpha_3\beta_2$ , también se ha visto implicado en procesos de adquisición, consolidación y evocación de la memoria (Barros et al., 2004). Y se han observado efectos amnésicos ocasionados por dihidro- $\beta$ -eritroidina, al enlazarse a receptores  $\alpha_3\beta_2$  de la corteza frontal (Granon, 1995).

---

---

Dado lo anterior, es posible que el deterioro en la retención ocasionado por la administración de erisodina en el hipocampo dorsal, no es mayor al que produjo la administración de DHBE debido a que, dada la alta especificidad de erisodina, este alcaloide sólo antagonice receptores  $\alpha_4\beta_2$  presentes en el hipocampo dorsal. Es conocido que DHBE tiene afinidad a receptores  $\alpha_3\beta_2$  y  $\alpha_7$  que se han encontrado en el hipocampo; si estos se distribuyen en la región dorsal del hipocampo, es probable que al antagonizarlos con DHBE su efecto de deterioro sobre la consolidación de la tarea de evitación se suma al que ocasiona DHBE cuando antagoniza a receptores  $\alpha_4\beta_2$ ; esto podría explicar el porque en nuestro estudio no es posible que el deterioro con erisodina sea superior al de DHBE. Sin embargo esta explicación deberá someterse a prueba experimental. De allí que es conveniente diseñar una estrategia experimental que pruebe si los receptores  $\alpha_3\beta_2$  y  $\alpha_7$  están presentes en el hipocampo dorsal y si hacen su aporte al deterioro de la consolidación de la tarea de evitación inhibitoria.

Por otro lado, analizando el estudio de afinidad de erisodina a receptores  $\alpha_4\beta_2$  realizado por Decker et al., (1995a) se tiene que en el modelo experimental *in vitro* utilizado por estos investigadores se prepararon fracciones de membrana enriquecida, lo que podría atribuir menos precisión al resultado debido a que se trata de un homogeneizado de tejido, en donde no solo va estar presente el receptor  $\alpha_4\beta_2$  nicotínico si no una gran variedad de receptores nicotínicos.

---

Debido a la coexistencia de diferentes subtipos de nAChRs, en el mismo núcleo cerebral e incluso en la misma neurona, hay dificultades en el estudio de las propiedades individuales de cada subtipo. Por lo que adicionalmente se propone, determinar la afinidad de erisodina utilizando el método de expresión heteróloga del receptor  $\alpha_4\beta_2$  en ovocitos de *Xenopus leavis*; para después llevar a cabo el registro electrofisiológico *in vitro* como opción para el conocimiento de las propiedades electrofisiológicas y farmacológicas del receptor y de los alcaloides. De hecho, la mayor parte de la información funcional de los receptores nicotínicos neuronales ha sido obtenida así, y en menor grado, en líneas celulares (Picciotto, et al., 2000).

En este estudio se evidenció que el bloqueo de los receptores nicotínicos  $\alpha_4\beta_2$ , y posiblemente también de los receptores  $\alpha_3\beta_2$  y  $\alpha_7$  del hipocampo dorsal, por los antagonistas erisodina y dihidro- $\beta$ -eritroidina, deterioró la consolidación de la memoria de la tarea aversiva. Esto sugiere la importancia de la interacción entre los receptores nicotínicos en esta región del cerebro sobre las bases de la función de memoria. Es conocido que la estimulación de receptores nicotínicos afecta la liberación de neurotransmisores, estos pueden ser inhibitorios como GABA o excitatorios como glutamato (Wonnacott, 1997). El hipocampo dorsal contiene interneuronas glutamatérgicas y GABAérgicas; con axones terminales noradrenérgicos, serotoninérgicos y colinérgicos que liberan neurotransmisores moduladores en el hipocampo (Freund y Buzsaki, 1996); como puede verse todos estos circuitos neuronales pudieran estar implicados en los efectos de deterioro observados.

---

---

Por otro lado, con anterioridad se han reportado diferencias funcionales entre el hipocampo dorsal y ventral (Levin et al., 2002; Lorenzini, 2006; 2007), proporcionando evidencias para una distinción importante del papel relativo de sistemas nicotínicos en el hipocampo dorsal y ventral en la memoria de trabajo de laberinto radial; sin embargo, sería conveniente establecer cual es el efecto del bloqueo de receptores nicotínicos del hipocampo ventral en el aprendizaje, consolidación y evocación de una tarea aversiva como la evitación inhibitoria. Estudios como éste son útiles para conocer la participación de los receptores acetilcolinérgicos nicotínicos en las diferentes etapas o fases del proceso mnemónico (adquisición, consolidación como es este el caso, o la evocación); si estos juegan o no un papel importante sobre los diferentes tipos de memoria (referencia, de trabajo, emocional, etc.), o bien si su presencia en regiones cerebrales anatómicas es determinante. En última instancia, la información obtenida aquí aporta información que se suma a la existente, para conocer los mecanismos celulares que subyacen a los procesos de memoria y aprendizaje y las estructuras cerebrales que participan; para en un futuro llevar a cabo el desarrollo de fármacos con utilidad médica.



---

---

## CONCLUSIÓN

Los antagonistas erisodina y dihidro- $\beta$ -eritroidina deterioraron la retención de la tarea de evitación inhibitoria, por lo que en este estudio se aportan evidencias de la participación de los receptores nicotínicos del subtipo  $\alpha_4\beta_2$  presentes en el hipocampo dorsal en la consolidación de la tarea aversiva.

## SUGERENCIAS

- Realizar estudios de biología molecular llevando a cabo la expresión heteróloga de receptores nicotínicos en ovocitos de *Xenopus leváis* para la caracterización funcional de los receptores. Este modelo también permitirá la caracterización farmacológica de los alcaloides obtenidos a partir de semillas del género *Erythrina*.
  
- Continuar con la evaluación del efecto del alcaloide erisodina en hipocampo dorsal sobre el aprendizaje y la evocación de la memoria en una tarea de evitación inhibitoria.
  
- Determinar la presencia de receptores  $\alpha_4\beta_2$  en hipocampo ventral y su participación en los procesos mnemónicos.

---

## LITERATURA CITADA

- Aguilar, C.A., Zolla, C. (1982). Plantas tóxicas de México. México: Instituto Mexicano del Seguro Social. 97-99.
- Alcorn, J.B. (1984). Huastec Mayan ethnobotany. Universidad de Texas: Press, Austin.
- [Alkondon, M.](#), [Pereira, E.F.](#), [Eisenberg, H.M.](#), [Albuquerque, E.X.](#) (1999). Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience*. 19(7):2693–2705.
- Ardila, A., Benavides, C.M. (1979). Aspectos biológicos de la memoria y el aprendizaje. México: Trillas. 31-34.
- Barros, D.M., Ramírez, M.R., Reis, E.A., Izquierdo, I. (2004). Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience*. 126:651-656.
- Bancroft, A., Levin, E. (2000). Ventral hippocampal  $\alpha_4\beta_2$  nicotinic receptors and chronic nicotine affects on memory. *Neuropharmacology*. 39:2770-2778.
- Bower, G.H., Hilgard, E.R. (1973). Teorías de Aprendizaje. México: Editorial Trillas.
- Bowman, W.C., Rand, M.J. (1985). Farmacología. Bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas. México: Interamericana.
- Brown, S.T., Wallace, M.P. (1986). Psicología Fisiológica. México: Interamericana. 690.
- Budowski, G. (2004). Paper & Speeches. Importancia, características de cercas vivas. [en red]. Disponible en: [www.ecouncil.ac.cr/about/speech/secretar/cercas.htm](http://www.ecouncil.ac.cr/about/speech/secretar/cercas.htm)
- Bye, R.A. (1986). Medicinal plants of the Sierra Madre: comparative study of Tarahumara and Mexican market plants. *Economic Botany*. 40(1):103-124.
- Carlson, N. (1994). Fisiología de la conducta. Barcelona: Editorial Ariel.
- Carlson, N.R. (2006). Fisiología de la conducta. Madrid, España: Pearson Educación. (8a Ed.). 774.
- Cooper, J.R. Bloom, F.E., Roth, R.H. (1996). The biochemical basis of neuropharmacology. New York: Oxford University Press.
- Court, J., Clementi, F. (1995). Distribution of nicotinic subtypes in human brain. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*. 9:6-14.
- Decker, M.W., Anderson, D.J., Brioni, J.D., Donnelly-Roberts, D.L., Kang, C.H., O'Neill, A.B., Piattoni-Kaplan, M., Swanson, S., Sullivan, J.P. (1995a). Erysodine, a competitive antagonist at neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Pharmacology*. 280:79–89.
- Decker, M.W., Brioni, J.D., Bannon, A.W., Arneric, S.P. (1995b) Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behaviour and implications for CNS therapeutics: minireview. *Life Science*. 56:545-570.
- De la Fuente, R., Álvarez, L.F.J. (1998). Biología de la mente. México: El Colegio Nacional y Fondo de Cultura Económica. 245-256.
- Duncan, C.P. (1949). The retroactive effect of electroshock on learning. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 42:32–44.

- 
- Dwoskin, L.P., Crooks, P.A. (2001). Competitive neuronal nicotinic receptor antagonists: a new direction for drug discovery. *Journal of Pharmacology*. 298:395–402.
- Fabian-Fine, R., Skehel, P., Errington, M.L., Davies, H.A., Sher, E., Stewart, M.G., Fine, A. (2001). Ultrastructural distribution of the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 21(20):7993-8003.
- FAO, Corporate. (1992). Reconversión ambiental y social de la ganadería bovina en Colombia. [en red ]. Disponible en: [www.fao.org/docrep/x3770t/x3770t05.jpg](http://www.fao.org/docrep/x3770t/x3770t05.jpg).
- Felger, R.S., Moser, M.B. (1974). Seri Indian pharmacopoeia. *Economic Botany*. 28(4):414-436.
- Felix, R., Levin, D.E. (1997). Nicotinic antagonist administration into the ventral hippocampus and spatial working memory in rats. *Neuroscience*. 18(4):1009-1077.
- Flores, C.M., Rogers, S.W., Pobreza, L.A., Wolfe, B., Kellar, K.J. (1992). A subtype of nicotinic cholinergic receptor is composed of  $\alpha_4$  and  $\beta_2$  subunit and is up regulated by chronic nicotine treatment. *Molecular Pharmacology*. 41:31-35.
- Freund, T., Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*. 6:347-470.
- García-Mateos R., Garín-Aguilar, M., Soto-Hernández, M., Martínez, V.M. (2000). Effect of  $\beta$ -erythroidine and dihidro- $\beta$ -erythroidine from *Erythrina Americana* on rats aggressive behaviour. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 10 (1):34-37.
- García-Mateos R., Soto-Hernández, M., Nelly D. (1998). Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to México. *Biochemical Systematics and Ecology*. 26:545-551.
- Garín-Aguilar, M.E., Ramírez, L.J.E., Soto Hernández, M., Valencia del Toro, G., Martínez, V.M. (2000). Effect of crude extracts of *Erythrina americana Mill.* on aggressive behaviour in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 69:189-196.
- Goddard, G.V. (1964). Amygdaloid stimulation and learning in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 58:23–30.
- Gold, E.P. (1986). The use of avoidance training in studies of modulation of memory storage. *Behavioral and Neural Biology*. 46:87-98.
- Gotti, C., Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*. 74:363-396.
- Granon, S., Poucet B., Thinusblanc C., Changeux J.P., Vidal C. (1995). Nicotinic and muscarinic receptors in the rat prefrontal cortex: differential roles in working memory, response selection and effortful processing. *Psychopharmacology*. 119:139–144.
- Haines, D.E. (2003). Principios de Neurociencia. España: Elsevier Science. (2a Ed.). 582.
- Harvey, S.C., Luetje, C.W. (1996). Determinants of competitive antagonist sensitivity on neuronal nicotinic receptor beta subunits. *Journal of Neuroscience*. 16:3798-3806.
- Hardman, J., Limbird, L. (2003). Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. México: MacGraw Hill. (10a Ed.). 123-163.

- 
- Harvey, S.C., Maddox, F.N., Luetje, C.W. (1996). Multiple determinants of dihydro beta-erythroidine sensitivity on rat neuronal nicotinic receptor alpha subunits. **Neurochemistry**. 67:1953-1959.
- Hastings, R.B. (1990). Medicinal legumes of Mexico: Fabaceae, Papilionoideae, Part one. **Economic Botany**. 44(3):336-348.
- Hebb, D.O. (1949). The organization of behavior: A neuropsychological theory. New York: Wiley.
- Izquierdo, I., Barros, D.M., Mello e Souza, T., de Souza M.M., Izquierdo, L.A., Medina, J.H. (1998a). **Nature**. 393:635-636.
- Izquierdo, I., Medina, J.H., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., de Souza M.M., Mello e Souza, T. (1998b). Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. **Neurobiology of Learning and Memory**. 69:219-224.
- Izquierdo, I., Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Mello e Souza T., de Souza M. M., Quevedo, J., Rodrigues, C., Sant' Anna M.K., Madruga, M., Medina, J.H. (1998c). Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short- and long-term memory. **Behavioral Pharmacology**. 9:421-427.
- Izquierdo, L.A., Barros, D.M., Vianna, M.R.M., Coitinho, A.S., deDavid e Silva, T., Choi, H., Moletta, B., Medina, J.H., Izquierdo, I. (2002). Molecular pharmacological dissection of short-and long-term memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**. 22:269-288.
- Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (2001). Principios de neurociencia. Madrid, España: Mcgraw-Hill interamericana.
- Kimble, G.A. (1969). Hilgard y Marquis. Condicionamiento y Aprendizaje. México: Trillas.
- Kimble, D.P. (1982). La psicología como ciencia biológica. Mexico: Trillas. 174-192.
- Kovács, De Wied, (1994). Peptidergic modulation of learning and memory processes. **Pharmacological Reviews**. 46:269-291.
- Levin, D.E. (1997). Nicotinic agonist and antagonist effects on memory. **Drug Development Research**. 38:188-195.
- Levin, D.E., Bradley, A., Addy, N., Sigurani, N. (2002). Hippocampal  $\alpha_7$  and  $\alpha_4\beta_2$  nicotinic receptors and working memory. **Neuroscience**. 109(4):757-765.
- Levin, D.E., McClernon, F., Rezvani, A. (2006). Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification and anatomic localization. **Psychopharmacology**. 184(3-4):523-39.
- López, V.H., García, C.J. (2003). La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en Trastornos del sistema nervioso central. **Salud Mental**. 26 (3):66-72.
- Lorenzini, A.C., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, B. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rats passive avoidance response: a tetrodotoxin functional inactivation study. **Brain Research**. 730:32-39.
- Lorenzini, A.C., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B., Tassoni, B. (1997). Role of ventral hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rats passive avoidance response memory trace. **Brain Research**. 768:242-248.

- 
- Luetje, C.W., Wada, K., Rogers, S., Abramson, S.N., Tsuji, K., Heineman, S., Patrick, J. (1990). Neurotoxins distinguish between different neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations. **Journal of Neurochemistry**. 55:632-640.
- Maldoni B. (1991). Alkaloids: Isolation and Purification. **Journal of Chemical Education**. 68(8):700-703.
- McDougall, W. (1901). Experimentelle beitrage zur lehre vom gedachtniss. **Mind**. 10:388-394.
- McGaugh, J. L. (1966). Time-dependent processes in memory storage. **Science**. 153:1351-1358.
- McGaugh, J.L. (1973). Drug facilitation of learning and memory. **Annual Review of Pharmacology**. 13:229-241.
- McGaugh, J.L. (1989). Dissociating learning and performance: drug and hormones enhancement of memory storage. **Brain Research Bulletin**. 23:339-345.
- McGauh, J.L. (1999). The perseveration-consolidation hypothesis: Muller and Pilzecker, 1900. **Brain Research Bulletin**. Vol 50:445-446.
- Mogg, A.J., Whiteaker, P., McIntosh, M., Marks, M., Collins, A.C., Wonnacott, S. (2002). Methyllycaconitine is a potent antagonist of  $\alpha$ -Conotoxin-MII-sensitive presynaptic nicotine acetylcholine receptors in rat striatum. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 302:197-204.
- Morton, J.F. (1981). Atlas of medicinal plants of Middle America. Bahamas to Yucatan. Illinois, U.S.A: Charles C. T. 1420.
- Morton, J.F. (1994). Pito (*Erythrina berteroana*) and Chipilin (*Crotalaria longirostrata*), (Fabeacea), Two Soporific Vegetables of Central America. **Economic Botany**. 48(2):130-138.
- Müller, G.E., Pilzecker, A. (1900). Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtniss. **Zeitschrift fuer Psychologie**. 1:1-288.
- Musalem, M.A. (1992). Erythrina in México: Occurrence, use and research. International conference on Erythrina in the New and Old World. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Octubre 19-23. Turrialba. Costa Rica.
- Neill, D.A. (1993). The genus Erythrina: taxonomy, distribution and ecological differentiation. *Erythrina in the old and new worlds*. **Missouri Botanical Garden Bulletin**. 63:166.
- Nott, A., Levin, D.E. (2006). Dorsal hippocampal  $\alpha_7$  and  $\alpha_4\beta_2$  nicotinic receptors and memory. **Brain Research**. 1080:72-78.
- Pardee tree nursery. (2007). [en red]. Disponible en: [www.pardeetree.com/Product6.html](http://www.pardeetree.com/Product6.html)
- Paxinos G., Watson C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. (8ª Ed.) San Diego: Academic Press.
- Picciotto R.M., Barbara J. Caldarone, King L.S., Zachariou, V. (2000). Nicotinic receptors in the brain: links between molecular biology and behaviour. **Neuropsychopharmacology**. 22:451-465.
- Prado, A.R.A. Y Quirarte, G.L. (1998). De la Memoria y el Cerebro. En: De la Fuente, Álvarez, L.F.J. (Eds.). Biología de la Mente. México: El Colegio Nacional y Fondo de Cultura Económica. 245-256.
- Prado, A.R., Quiroz, R.C., Garín, M.E., Díaz, T.A., Díaz del Guante, M.A., Galindo, L.E., Martínez, I., Quitarte, G.L. (2004). Memoria: Consolidación

- 
- y Experiencia. En: Velásquez M.J. (Ed). Temas Selectos de Neurociencias III. México: Universidad Autónoma de México. 127-136.
- SEMARNAP. (2004). Especies con usos no maderables en bosque de encino, pino y pino-encino. [en red]. Disponible en: <http://148.233.168.204/pfnmz/fichas/erythina-americana.htm>.
- Sharples, C.G.V., Wonnacott, S. (2001). Neuronal nicotinic receptors. *Tocris Reviews*. 19:1-12.
- Rivera, I. (1943). Algunas plantas medicinales de Izucar de Matamoros y Pueblos anexos. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México*. 14(1):37-67.
- Russell, W.R., Nathan, P.W. (1946). Traumatic amnesia. *Brain*. 69:280–300.
- Sagrera, F.J. (1982). Tratamiento de enfermedades por medio de las plantas. México: Editorial del Valle de México S.A. De C.V. 3-4.
- Trek Nature. (2007). [en red]. Disponible en: [www.treknature.com/.../photo68568.htm](http://www.treknature.com/.../photo68568.htm).
- Villanueva, C. (2006). Importancia de las cercas vivas en fincas ganaderas. Disponible [en red]: [www.virtualcentre.org/es/en/keynotez6.htm](http://www.virtualcentre.org/es/en/keynotez6.htm)
- Whiting, P. Schoepfer, R. Lindstrom, J., Priestly, T. (1992). Structural and pharmacological Characterization of the major brain nicotinic acetylcholine receptor subtype stably expressed in mouse fibroblasts. *Molecular Pharmacology*. 40:463-466.
- Williams, M., Robinson, J.L. (1984). Binding of the nicotinic cholinergic antagonist dihydro- $\beta$ -erythroidine in rat brain, tissue. *The Journal Neurosciences*. 4:2906-2910.
- Wikipedia. (2007). Acetilcolina. Disponible [en red]: [www.-ermm.cbcu.cam.ac.uk/nfig003mgu.gif](http://www.-ermm.cbcu.cam.ac.uk/nfig003mgu.gif).
- Wonnacott, S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends in Neurosciences*. 20:92-98.

---

---

## **ANEXO 1.- PERFUSIÓN. REACTIVOS Y PROCEDIMIENTO**

Una vez terminada la evaluación conductual los animales de cada grupo fueron procesados de la siguiente manera para obtener su cerebro.

- 1.-Inyección intraperitoneal con una sobredosis de pentobarbital sódico.
- 2.-Realizó un corte horizontal sobre la piel que cubre el vientre.
- 3.-Bloqueo de la vena femoral.
- 4.-Punción intracardiaca, y con bomba de perfusión se dejó fluir de 150-200 mL de solución salina por esta vía.
- 5.- Ahora se hacen fluir 150-200 mL de formaldehído al 10%\* para fijación del tejido.
- 6.-Cortar con guillotina la cabeza de la rata.
- 7.-Extraer el cerebro procurando no dañar con el instrumental.
- 8.-Colocar el cerebro por dos días en un frasco con solución de formaldehído al 10% (post-fijación)
- 9.-Los frascos debieron haber sido previamente etiquetados con la siguiente información: número de rata, grupo experimental al que pertenece, fecha y nombre del experimentador.

### **\*PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE FORMOL AL10% BUFFERADO PARA UN LITRO DE SOLUCIÓN**

Formaldehído.....	100ml
Fosfato de sodio monobasico .....	4 gramos
Fosfato de sodio di-basico.....	6.5 gramos
Agua destilada.....	900 mililitros.

Disolver las sales de fosfato en agua a 25°C y con agitación constante, una vez disueltas, adicionarlas a los 900ml de agua destilada. Finalmente añadir el formaldehído. Agitar vigorosamente y filtrar para almacenarse en garrafón.

### **ANEXO 2.- TINCIÓN DE NISSL**

---

---

Para facilitar la observación al microscopio y ubicar la posición de la punta de las cánulas, los cerebros obtenidos de los diferentes sujetos, se colocaron en una matriz de acero inoxidable para hacer un corte grueso que permitió seleccionar la región cerebral donde se habían insertado las cánulas. Posteriormente, utilizando el crióstato, se realizaron cortes coronales de 50 micras de espesor para después ser teñidos mediante la técnica de Nissl. Los pasos esenciales de dicho procedimiento se describen a continuación.

1.-Los cortes coronales de 50 micras de espesor obtenidos con el crióstato fueron montados en portaobjetos, que previamente se impregnaron con una solución de gelatina-cromo (ver anexo 2).

2.- Después de que se secaron, las preparaciones fueron sumergidas en solución salina durante sólo 30 segundos.

3.-Enjuague rápido con agua destilada.

4.-Sumergir en alcohol al 80% acidulado durante 1 minuto.

5.-Enjuague rápido con agua destilada.

6.-Sumergir de 10 - 15 minutos en violeta de cresilo que fue preparado con 1.2g de violeta de cresilo, aforado a 500ml con agua destilada.

7.-Enjuague rápido con agua destilada.

8.-Sumergir en alcohol al 70% por 2 minutos.

9.-Sumergir en alcohol al 80% por 2 minutos.

11.-Sumergir en alcohol al 96% hasta contrastar.



---

---

12 Nuevamente sumergir en alcohol al 96% hasta ver más nítida la preparación.

10.-Sumergir en alcohol al 100% por 30 segundos.

11.- Sumergir en terpineol por 30 segundos.

12.- Sumergir en xileno I por 4 minutos.

13.- Sumergir en xileno II por 2 minutos.

14.- Por último, las preparaciones son montadas con entellan en los cubreobjetos gelatinizados.

---

### **ANEXO 3.- PREPARACIÓN DE PORTAOBJETOS**

Todos los portaobjetos fueron lavados con agua y jabón y bien enjuagados con agua destilada para después dejarse secar. La solución de gelatina-cromo se preparó y los portaobjetos se impregnaron con ella, como se indica a continuación.

#### **SOLUCIÓN DE GELATINA-CROMO**

- 1.-Calentar 500ml de agua destilada a 50-60°C.
- 2.-Adicionar 3g de gelatina sin saborizante.
- 3.-Adicionar 0.3g de  $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2$ .
- 4.-Adicionar 500ml de agua destilada fría.
- 5.-Filtrar la solución en un frasco ámbar.

NOTA: Todos los portaobjetos fueron sumergidos por 60 segundos en esta solución y se dejaron secar a 4-50°C. De preferencia sumergir lo portaobjetos por 5 ocasiones consecutivas después de secar completamente.