



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CARRERA DE BIOLOGIA

T E S I S

**EFFECTO DEL ALCALOIDE ERISOPINA OBTENIDO DE
Erythrina americana EN LOS RECEPTORES
NICOTÍNICOS $\alpha 4\beta 4$.**



QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A:

CLARA ROBLES ALVAREZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. JOSÉ JESÚS GARCÍA COLUNGA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



**Av. De los barrios N° 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. de
México CD 54090. 2012**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos.

Mi agradecimiento a la Dra. María Eugenia Garín Aguilar. (Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM) por proveer el alcaloide erisopina.

A los Dres. J. Boulter y S. Heinemann (Instituto Salk) por proveer los clones de los receptores nicotínicos

A mis directores Dr. José de Jesús García Colunga y Dra. María Eugenia Garín Aguilar, por brindarme su amistad y su apoyo incondicional, por todos los consejos, por compartir su conocimiento, por creer siempre en mí, por su paciencia y su valioso tiempo invertido en esta investigación.

A Dr. Gustavo Valencia del Toro, Dr. Juan Manuel Arias y Dra. Leonor Abundis por sus valiosas contribuciones a este trabajo.

A M en C. Luis Antonio Hernández, por sus consejos, su tiempo, su apoyo incondicional, pero por sobre todo por brindarme su amistad a lo largo de mi carrera.

A cada una de las personas que me brindaron su ayuda incondicional y su amistad.

Dedicatoria

A mi familia, por llenar de luz mi existencia.

A mis hijos, Carlos, Lynne y Lenin por llenar mi vida de alegrías. Ellos me motivan a ser mejor cada día.

A ti flaquito, por alentarme a estudiar una carrera. Siempre paciente y dispuesto a ayudarme. Gracias por esta vida llena de aventuras.

A Antonia Alvarez Medina, además de ser mi madre, una amiga siempre dispuesta a escucharme, la que me apoya en mis decisiones. Gracias por acompañarme en cada momento de mi vida, por tu apoyo, tus consejos y por darme palabras de ánimo en todo momento.

A mis hermanos, por su cariño, comprensión y por compartir los momentos importantes que llegan a nuestras vidas. Gracias por su apoyo.

A mi hermano José Robles Alvarez por invertir de su tiempo jugando con los peques, siempre dispuesto a ayudar. Gracias por tu tiempo, cariño y por compartir tus inagotables risas.

A mi tía María Guillermina Alvarez Medina por enseñarme que con disciplina, constancia y objetivos claros se puede realizar cualquier cosa en esta vida.

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

1. CONTENIDO

1. CONTENIDO	1
1.1. Índice de figuras	5
1.2. Glosario de términos y abreviaturas usadas.....	7
Resumen	8
Summary	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Receptores nicotínicos de acetilcolina.....	10
2.1.1. Estructura	11
2.1.1.1. Estructura molecular de los receptores nicotínicos.....	14
2.1.2. Estados funcionales de los receptores nicotínicos	16
2.1.3. Distribución	19
2.1.3.1. Distribución neuronal de los receptores nicotínicos.....	21
2.1.4. Papel funcional	25
2.1.5. Patologías.....	26
2.1.5.1. Enfermedad de Alzheimer	27
2.1.5.2. Enfermedad de Parkinson	28
2.1.5.3. Trastorno por déficit de atención	28
2.1.5.4. Esquizofrenia	28
2.1.5.5. Síndrome de Gilles de la Tourette	29
2.1.5.6. Ansiedad.....	30
2.1.5.7. Depresión	30

2.1.5.8. Epilepsia	30
2.1.5.9. Síndrome de Down	31
2.2. Género <i>Erythrina</i>	32
2.2.1. Taxonomía	34
2.2.2. Química	35
2.2.3. Actividad biológica de <i>E. americana</i>	35
2.2.4. Farmacología.....	37
2.2.5. Estructura de los alcaloides de <i>Erythrina</i>	39
3. HIPÓTESIS	42
4. OBJETIVOS	43
4.1. GENERAL.....	43
4.2. PARTICULARES	44
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	45
5.1. Obtención de ARN codificante	
para cada subunidad del receptor nicotínico.	45
5.1.1. Bacterias TB1 calcio competentes.....	46
5.1.2. Transformación de bacterias	47
5.1.3. Multiplicación del plásmido	48
5.1.4. Obtención de ADN plasmídico mediante método de lisis alcalina.	48
5.1.5. Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro	51
5.1.6. Linearización de ADN con enzimas de restricción.....	52
5.1.7. Purificación de ADN linearizado	
por el método de extracción fenol-cloroformo	54
5.1.8. Transcripción <i>in vitro</i>	56

5.1.9. Purificación de ARN	
por el método de extracción fenol-cloroformo	57
5.1.10. Cuantificación de ARN en el espectrofotómetro	58
5.2. Material biológico	59
5.2.1. Ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	
como modelo para el estudio de receptores	59
5.2.2. Preparación de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	
para microinyección	60
5.2.3. Microinyección	62
5.3. Registros electrofisiológicos	63
6. RESULTADOS	65
6.1. Corriente control activada por acetilcolina	65
6.2. Efecto inhibitorio de erisopina en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$	68
6.3. Relación concentración de erisopina vs efecto	70
6.4. Erisopina como antagonista competitivo	73
6.5. Efecto de erisopina en comparación con otros antagonistas	75
6.6. Relación concentración	
de erisopina vs efecto en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$	78
6.7. Erisopina en receptores nicotínicos musculares $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$	80
6.8. Erisopina potente antagonista de receptores $\alpha 4\beta 2$	81
6.9. RESUMEN DE RESULTADOS	83
7. DISCUSIÓN	84
8. CONCLUSIONES	89

9. PERSPECTIVAS.....	90
10. REFERENCIAS.....	91

1.1. Índice de figuras

Figura 1. Tipos de receptores nicotínicos.....	11
Figura 2. Estructura de un receptor nicotínico.....	13
Figura 3. Estructura molecular de los receptores nicotínicos de la acetilcolina.....	15
Figura 4. Sitios de unión de acetilcolina en los receptores nicotínicos neuronales.....	16
Figura 5. Estados Conformacionales de los receptores nicotínicos..	18
Figura 6. Distribución de los receptores nicotínicos..	24
Figura 7. Distribución mundial de <i>Erythrina</i>	33
Figura 8. <i>Erythrina americana</i>	34
Figura 9 . Alcaloides de <i>Erythrina</i>	40
Figura 10. Estructura de los alcaloides diénicos	40
Figura 11. Estructura de los alcaloides alquénicos.	41
Figura 12 . Estructura de los alcaloides lactónicos.....	41
Figura. 13. Rana <i>Xenopus laevis</i> adulta.....	61
Figura. 14. Disección de rana, lóbulos y ovocitos.	62
Figura. 15. Efecto de erisopina en corrientes activadas..... por acetilcolina en el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 4$	67
Figura. 16. Efecto inhibitorio de erisopina en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$.	69

Figura. 17. Bloqueo de la respuesta de acetilcolina por erisopina en función de su concentración.	72
Figura 18. Erisopina como antagonista competitivo de los receptores nicotínicos neuronales.....	74
Figura 19. Erisopina en comparación con antagonistas competitivos.....	76
Figura 19. Antagonista competitivo de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$.	79
Figura 21. Erisopina potente antagonista de receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$	82

1.2. Glosario de términos y abreviaturas usadas

5HT :	Serotonina
ACh:	Acetilcolina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
DH β E:	Dihidro beta eritroidina.
EA:	Enfermedad de Alzheimer
EADLF:	Epilepsia autosómica dominante del lóbulo frontal
EP:	Enfermedad de Parkinson
GABA:	Ácido γ -amino butírico
IC ₅₀ :	Concentración que inhibe el 50% de la unión.
K_d :	Constante de disociación para la interacción ligando-receptor
kDa:	Kilo Daltones
K_i :	Constante de inhibición para la interacción compuesto-receptor
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
RCF	Fuerza Centrífuga Relativa
SGT:	Síndrome de Gilles de la Tourette
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Sistema nervioso periférico
TDA:	Trastorno por déficit de atención
α -BTX:	α -bungarotoxina

Resumen

Los receptores nicotínicos pertenecen a la superfamilia de los canales iónicos activados por ligando para acetilcolina, los cuales incluyen receptores para GABA, serotonina y glicina. Los receptores nicotínicos son glicoproteínas, de aproximadamente 290 kDa, ensambladas por subunidades (α , β , γ y δ). En el Sistema Nervioso Central, las diferentes combinaciones de subunidades ($\alpha 2$ - $\alpha 10$, $\beta 2$ - $\beta 4$) producen múltiples subtipos de receptores nicotínicos, que muestran diferentes propiedades funcionales. Los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$ de rata fueron expresados en ovocitos *Xenopus laevis* para probar su sensibilidad al alcaloide erisopina. Los registros electrofisiológicos mostraron que erisopina inhibe las corrientes inducidas por acetilcolina en los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ dependiendo de su concentración, con una IC_{50} de 9.3 nM, mientras que para receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ la IC_{50} es menor (2.74 nM). Erisopina actúa como antagonista competitivo en estos dos subtipos de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$ activados con acetilcolina. En comparación con dihidro- β -eritroidina y erisodina (alcaloide extraídos del género *Erythrina*), La inhibición de la corriente generada por 500 nM de ACh fue $76.1 \pm 3\%$ con 20 nM de erisopina, $46.03 \pm 1.1\%$ con 20 nM de erisodina y $17.58 \pm 3.3\%$ con DH β E. De estos tres antagonistas erisopina es el más potente inhibir a los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$

Palabras Clave: Erisodina, Erisopina, receptores nicotínicos, ovocitos, *Xenopus laevis*.

Summary

The nicotinic acetylcholine receptors belong to the superfamily of ligand activated ion channels, which include receptors for GABA, serotonin and glycine. The nicotinic acetylcholine receptors are glycoproteins, of approximately 290 kDa, assembled with subunits (α , β , γ and δ). In the Central Nervous System, different combinations of subunits (α_2 - α_{10} , β_2 - β_4) produce multiple subtypes of nicotinic acetylcholine receptors, with different functional properties. The rat nicotinic acetylcholine receptors $\alpha_4\beta_4$ and $\alpha_4\beta_2$ were expressed in *Xenopus laevis* oocytes to test their sensitivity to erisopine alkaloid. Electrophysiological recordings showed that erisopine inhibits currents induced by acetylcholine in nicotinic acetylcholine receptors $\alpha_4\beta_4$ depending on its concentration, with an IC_{50} of 9.3 nM, while for nicotinic acetylcholine receptors $\alpha_4\beta_2$ the IC_{50} is less (2.74 nM). Erisopine acts as competitive antagonist of nicotinic acetylcholine receptors $\alpha_4\beta_4$ and $\alpha_4\beta_2$ activated by acetylcholine. Compared with erisodine and dihydro- β -erythroidine (alkaloid extracted from the genus *Erythrina*). The inhibition of the current generated with ACh 500 nM was $76.1 \pm 3\%$ by erisopine 20 nM, $46.03 \pm 1.1\%$ with 20 nM of erisodine and $17.58 \pm 3.3\%$ with 20 nM of DH β E. Erisopine was the most potent to inhibit nicotinic acetylcholine receptors $\alpha_4\beta_4$

Key words: Erisodine, Erisopine, Nicotinic receptors, oocytes, *Xenopus laevis*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Receptores nicotínicos de acetilcolina

Los receptores colinérgicos pueden dividirse en muscarínicos y nicotínicos, basados en la actividad de los alcaloides agonistas naturales muscarina y nicotina.

La acetilcolina es un neurotransmisor que activa a estos dos tipos de receptores, ambas clases difieren en estructura química, así como en sus propiedades farmacológicas y fisiológicas. Unos son denominados receptores ionotrópicos (los receptores nicotínicos) y los otros receptores metabotrópicos (receptores muscarínicos).

Los receptores nicotínicos pertenecen a la superfamilia de los canales iónicos activados por ligando, los cuales incluyen receptores neuronales de acetilcolina, ácido γ -amino butírico (GABA_A), de la glicina y de la serotonina (5HT₃) (Barrantes, 1996; Arias, 2000; Le Novere *et al.*, 1999). Son complejos formados por cinco polipéptidos que forman el canal iónico a través de la membrana. La unión del neurotransmisor al receptor induce una serie cambios conformacionales que causan la apertura del canal, permitiendo un flujo iónico dependiente de un gradiente electroquímico de los iones que fluyen a través del canal (Waxhman, 1999).

Los receptores nicotínicos han sido clasificados de acuerdo con las subunidades que los conforman y a su distribución en el organismo (Figura 1). Los receptores nicotínicos musculares o periféricos están compuestos por las subunidades $\alpha 1, \beta 1, \gamma$ y δ o ϵ . Los receptores nicotínicos neuronales están

constituidos por una combinación de subunidades α (α_2 – α_6) y β (β_2 – β_4) o bien formados por cinco subunidades idénticas (α_7 – α_9) (Changeux y Edelman, 2001).

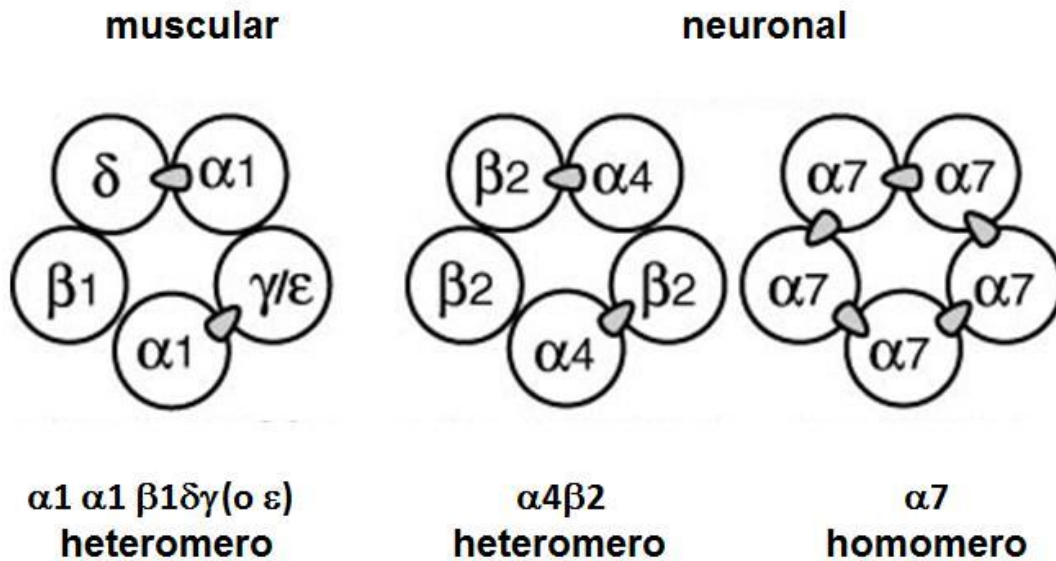


Figura 1. Tipos de receptores nicotínicos y su composición de acuerdo a las subunidades que los conforman. Los receptores nicotínicos son estructuras pentaméricas compuestas por subunidades α y β con distintos patrones de expresión.

a) receptor nicotínico muscular y b) receptor nicotínico neuronal, marcados con triángulos los sitios de unión de la acetilcolina. (Tomado de Vázquez y Bonilla, 2004).

2.1.1. Estructura

El receptor nicotínico es una proteína de aproximadamente 290 kDa, ensamblada por subunidades (α, β, γ y δ o ϵ) en forma de anillo alrededor de un poro central, cada subunidad atraviesa la membrana lipídica formando cuatro dominios transmembranales hidrofóbicos denominados M1 a M4. Los aminoácidos

que forman el dominio M2 de cada subunidad forman la pared del canal iónico.

Los aminoácidos que conforman el canal están arreglados de tal manera que forman tres anillos de aminoácidos cargados negativamente orientados hacia el interior del canal. Estos anillos aparentemente confieren una gran selectividad al paso de cationes (Na^+ , K^+ y Ca^{+2}), en tanto que los aniones son repelidos debido a su carga eléctrica. El dominio intracelular está formado por un asa grande entre M3 y M4, y una asa corta entre M1 y M2. El dominio extracelular hidrofílico posee los extremos carboxilo y amino de cada subunidad. Es en el extremo amino donde se localizan los sitios de unión al agonista. Los dominios M2-M3 están unidos por un asa extracelular corta (Figura 2; Corringer *et al.*, 2000; Hogg *et al.*, 2003). Las subunidades α y β conservan más del 80% de los aminoácidos en los distintos grupos de vertebrados, por lo que se cree que éstos comparten un ancestro en común (Le Novere y Changeux, 1995).

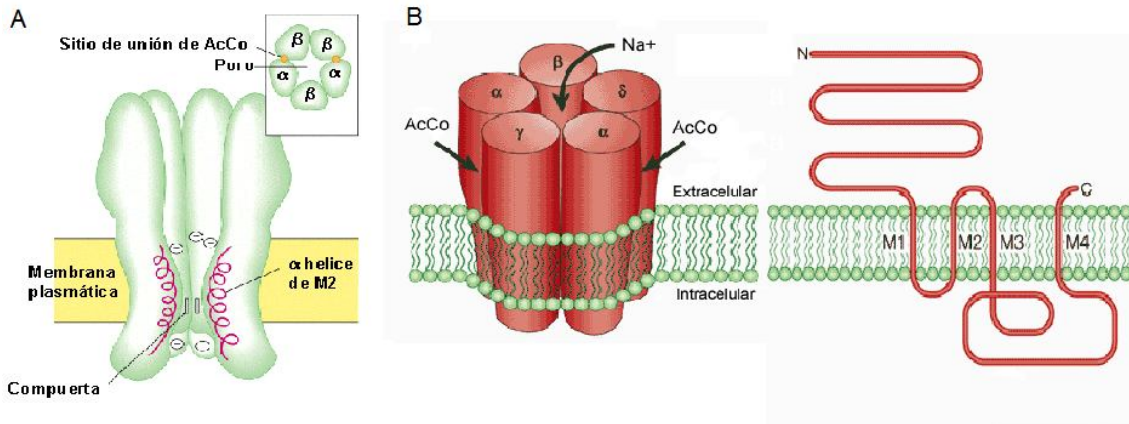


Figura 2. Estructura de un receptor nicotínico. El receptor nicotínico es un canal iónico activado por ligando. A. El receptor nicotínico de acetilcolina está compuesto por cinco subunidades (α o β), las cuales pueden ser monómeros (de α) o heterómeros (mezcla de α y β). B. Una subunidad del receptor nicotínico está compuesta por un dominio amino terminal extracelular, el cual contribuye con la unión del ligando (transmisor), y por cuatro dominios transmembranales denominados M1, M2, M3 y M4 (Changeux 2010).

2.1.1.1. Estructura molecular de los receptores nicotínicos

En las imágenes por difracción de rayos X se observa que las cinco subunidades presentan un arreglo cilíndrico casi simétrico alrededor de un poro central, un dominio extracelular más ancho y grande que el intracelular, y un dominio transmembranal estrecho, ver figura 3 (Unwin, 2000; 2005). El dominio extracelular representa aproximadamente el 50% de la masa total de cada una de las subunidades y está formado por aproximadamente 210 aminoácidos. En los receptores nicotínicos musculares el sitio de unión de alta afinidad se localiza en la interfase entre las subunidades $\alpha 1$ y la γ (Arias, 1998). Cada sitio de unión, a su vez, está conformado por dos regiones separadas. La primera tiene carga neta positiva y constituye el componente principal en la unión a la acetilcolina y está formada por tres asas (A, B y C) de aminoácidos de la subunidad α . La segunda región (complementaria) presenta una carga neta negativa y está formada por aminoácidos de las subunidades δ y γ (o ϵ) que forman cuatro asas denominadas 1, 2, 3 y 4. Se ha propuesto que el grupo cuaternario de amonio de la acetilcolina, cargado positivamente, interactúa con el sitio complementario con carga negativa, y el otro extremo de la molécula de la acetilcolina interactúa con el sitio principal (Figura 3, Prince y Sine, 1998).

En los receptores nicotínicos neuronales heteropentaméricos los dos sitios de unión de la acetilcolina están localizados en las interfases entre las subunidades α y β (Figura 4, Corringer *et al.*, 2000; Paterson y Nordberg, 2000).

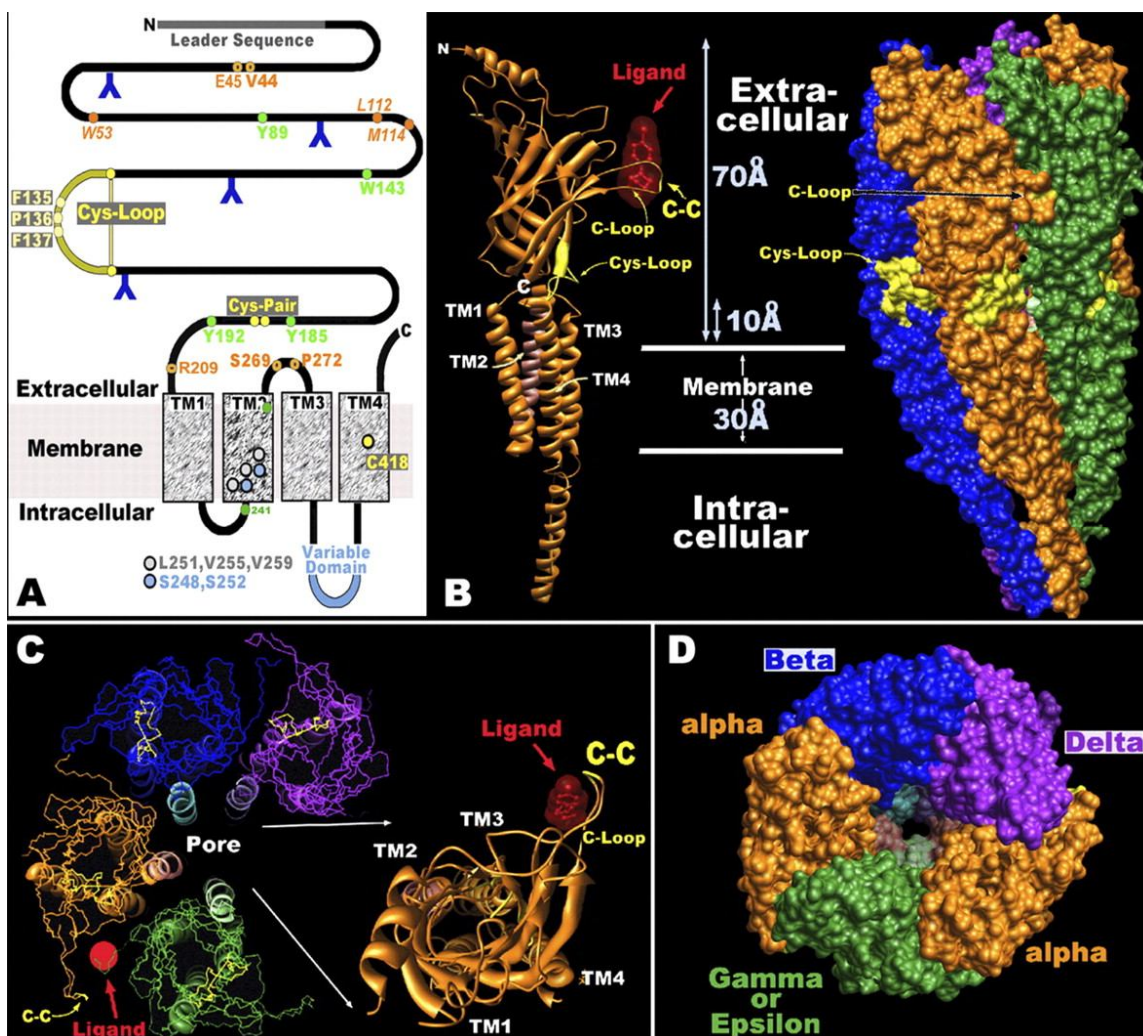


Figura 3. Estructura molecular de los receptores nicotínicos de la acetilcolina. A) secuencia lineal las subunidades del receptor nicotínico. Las subunidades α poseen un par de Cys-loop que se compone de dos cisteínas separadas por 13 aminoácidos y unidas por puentes disulfuro. Los residuos en verde son importantes para la subunidad α ya que contribuyen formando la cavidad del sitio de unión agonista y los residuos naranja son importantes para la subunidad β ; B) Estructura molecular (Unwin); C) El sitio de unión agonista está contenido en un bolsillo entre la subunidad α y otra subunidad; D) Los dominios extracelulares forman la boca del poro (Albuquerque *et al.*, 2009).

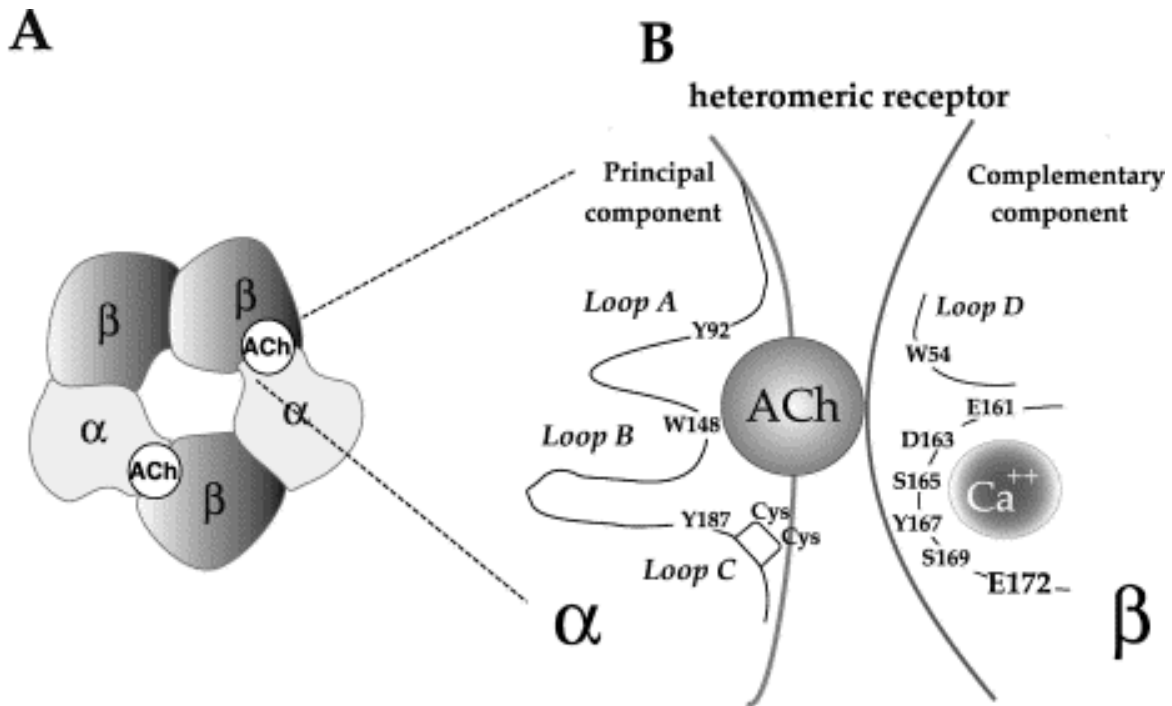


Figura 4. Sitios de unión de ACh en los receptores nicotínicos neuronales. A) Complejo heteropentamérico de un receptor nicotínico neuronal con subunidades α y β (estequiometría 2:3). Los sitios de unión se localizan en las interfases de las subunidades α y las subunidades β . B) Representación del principal componente (subunidad α) con sus tres asas A, B y C y las dos asas D, E del componente complementario (subunidad β). El asa E contribuye con en el sitio de unión que participa en la potenciación por calcio. (Tomado de drogas de abuso).

2.1.2. Estados funcionales de los receptores nicotínicos

Funcionalmente los diferentes subtipos de receptores nicotínicos presentan principalmente cuatro estados conformacionales: reposo, abierto y dos estados cerrados “desensibilizados” (I ó D; Figura 5).

En ausencia de agonistas, la mayoría de los receptores de Torpedo (80%) están en el estado de reposo (R) (Heidmann y Changeux, 1979), estando el 20% restante en su forma desensibilizada (D). El estado de reposo se caracteriza por su baja afinidad (K_d 100 μ M a 1 mM) por los agonistas y porque el canal iónico

está activable y cerrado al paso de cationes. La unión del agonista al receptor da lugar a un cambio conformacional del mismo originando así el estado abierto, proceso que lleva de microsegundos a milisegundos, y en el cual el canal iónico está abierto. En presencia constante de agonista, el receptor nicotínico fluctúa entre dos estados: conductor y no conductor durante varios milisegundos antes de entrar en un estado no conductor conocido como estado desensibilizado. Este estado de desensibilización consta de dos procesos cinéticos: un proceso rápido, que se da en un rango de tiempo de 100 ms (estado I) y uno lento en un rango de segundos a minutos (estado D), teniendo en ambos casos el receptor una alta afinidad por los agonistas (K_d 1 nM a 1 μ M). Además, la transición entre los diferentes estados del receptor pueden ser regulados por fosforilación del receptor (Changeux y Edelstein, 1998).

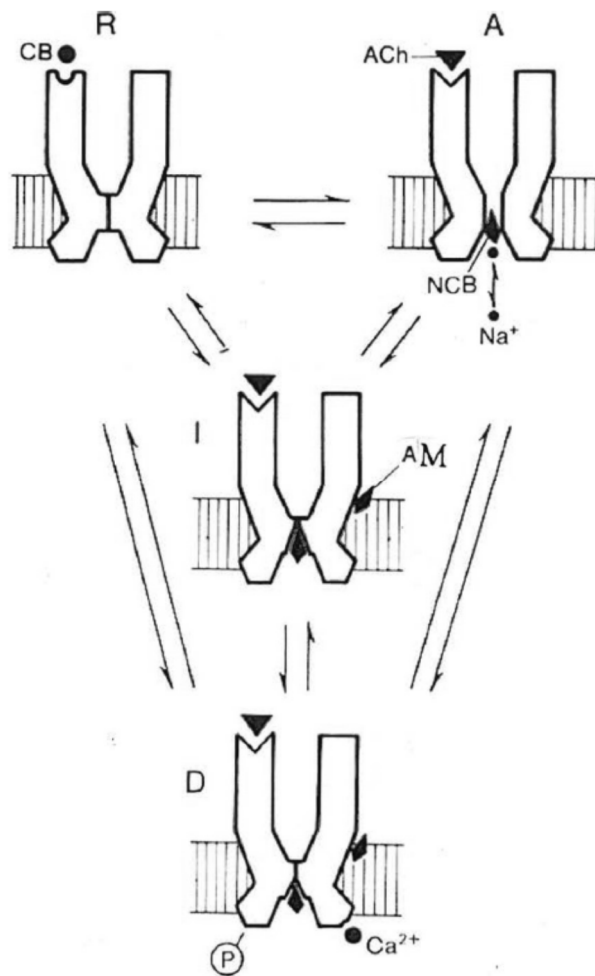


Figura 5. **Estados Conformacionales de los receptores nicotínicos.** Los distintos estados funcionales del receptor, se diferencian en la afinidad por el agonista y en el estado del canal iónico. La unión de dos moléculas de ACh al receptor en estado de reposo (R), produce la apertura del canal iónico asociado al mismo (A). La exposición prolongada al agonista provoca la desensibilización del receptor que puede ser un proceso rápido (100 ms, estado I) o bien lento de alrededor de segundos (estado D). Los estados R, D e I representan estados inactivos del receptor nicotínico con distinta afinidad por agonista. CB: bloqueador competitivo. NCB: bloqueador no competitivo. (Changeux, 1990).

2.1.3. Distribución

Los receptores nicotínicos se encuentran distribuidos en una gran variedad de organismos del reino animal, entre los que se incluyen tanto invertebrados como vertebrados. En vertebrados como aves y mamíferos se localizan principalmente en la unión neuromuscular y en el sistema nervioso (Clarke, 1999).

Los receptores nicotínicos son expresados por varios tipos celulares, se encuentran en el músculo esquelético y otras células no neuronales tales como la piel, el páncreas y el pulmón. También se encuentran ampliamente distribuidos en las neuronas del SNC y SNP (Albuquerque *et al.*, 2009).

En los vertebrados, los receptores nicotínicos musculares se encuentran densamente ubicados en las membranas de las fibras musculares esqueléticas y forman sinapsis con las neuronas motoras en la placa terminal. En contraste, los receptores nicotínicos musculares fetales, antes de que se forme la placa neuromuscular, se encuentran difundidos a lo largo de toda la superficie de las fibras musculares (Lindstrom, 2000).

En el músculo de vertebrados en la etapa fetal, los receptores nicotínicos presentan una subunidad γ en lugar de ϵ , presente en el receptor nicotínico adulto; esta sustitución ocasiona un cambio en sus propiedades biofísicas. Se cree que durante el desarrollo fetal el receptor nicotínico (subtipo fetal) permite mayor paso de iones (pese a que su conductancia es menor, su tiempo de apertura es mayor) durante las corrientes miniatura de la placa que pueden promover las contracciones espontáneas durante el desarrollo del músculo (Jaramillo *et al.*, 1988).

En el sistema nervioso periférico (SNP) se ha identificado el ARNm que codifica para las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$ en los ganglios autónomos de embriones y neonatos de pollo y rata.

Durante el desarrollo del SNP, las diferentes subunidades son finalmente reguladas (Zolí, 2000), pero en la etapa perinatal la expresión de algunos de ellos se reprime.

Los receptores nicotínicos están presentes en varios ganglios del SNP, principalmente en las divisiones simpática y parasimpática. En estas divisiones al producirse un potencial de acción presináptico, la acetilcolina es liberada por las terminales de las neuronas preganglionares, que al interactuar con los receptores nicotínicos generan un potencial excitador postsináptico, de suficiente intensidad para generar un potencial de acción en las neuronas postganglionares (Zolí, 2000).

En el SNC de vertebrados, los receptores nicotínicos se expresan en baja densidad y su patrón de distribución es relativamente heterogéneo (Clarke, 1999; Paterson y Nodberg, 2000).

En las neuronas del SNC los receptores nicotínicos no están limitados a la terminal postsináptica, también se encuentran presentes en la presinápsis, modulando la liberación de otros neurotransmisores.

Los receptores nicotínicos postsinápticos son importantes en el control de la transmisión sináptica rápida en el hipocampo y la corteza cerebral (Zolí, 2000).

Los receptores que contienen las subunidades $\alpha 9$ y $\alpha 10$ no han sido encontrados en el cerebro y la coexpresión de ambas es solo limitada a la cóclea y

a algunos ganglios. La subunidad $\alpha 9$ forma homómeros, mientras que la subunidad $\alpha 10$ forma canales funcionales solo cuando es coexpresada con la subunidad $\alpha 9$ (Dajas *et al.*, 2004).

2.1.3.1. Distribución neuronal de los receptores nicotínicos.

Los niveles de expresión de las subunidades de los receptores nicotínicos en el Sistema Nervioso Central (SNC) son significativamente más bajos que los receptores nicotínicos musculares (Sargent, 2000; Wada *et al.*, 1989). Las subunidades predominantes de los receptores nicotínicos en el SNC son $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\alpha 7$, mientras que en la periferia predominan $\alpha 3$ y $\beta 4$ (Paterson y Nordberg, 2000). Tomando en consideración esta predominancia de subunidades, los receptores nicotínicos más caracterizados son los subtipos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 7$, donde la acetilcolina es altamente afín a los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, mientras que se une con baja afinidad a los receptores nicotínicos $\alpha 7$.

Para identificar a los subtipos de receptores nicotínicos más abundantes en el SNC se han empleado técnicas de unión a ligando (binding), usando como marcadores para los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ nicotina, citisina o epibatidina marcada radiactivamente, y [125 I]-bungarotoxina (toxina de serpiente) para los receptores $\alpha 7$ (Levin 2002; Corringer *et al.*, 2000).

La distribución, así como los patrones de distribución de las subunidades de los receptores nicotínicos en el SNC, han sido observados en roedores y

mamíferos; estos niveles y patrones varían dependiendo de las técnicas empleadas (Paterson y Nordberg, 2000).

La subunidad β_2 se expresa en todas las regiones del Sistema Nervioso Central; su distribución se traslapa al menos con las subunidades α (2-4,6) (Sargent, 2000; Wada *et al.*, 1989). Aunque la subunidad α_4 también se expresa abundantemente, su distribución en el SNC es menor que β_2 , por lo que α_4 se localiza en un mayor número de regiones. Las más altas concentraciones de estas dos subunidades se encuentran en el hipocampo, tálamo y corteza (Sargent, 2000; Wada *et al.*, 1989). La subunidad α_7 también está expresada en la mayor parte del cerebro, con los niveles de expresión más altos en la corteza y en el hipocampo, pero en las zonas donde la subunidad está ausente o expresada en niveles muy bajos es en la región talámica o en los ganglios basales (Picciotto *et al.*, 2000; Sargent, 2000).

La distribución de las subunidades menos abundantes de los receptores nicotínicos en el SNC es mucho más limitada. Éstas se encuentran ampliamente expresadas en el SNP. Las subunidades α_3 y β_4 se encuentran localizadas en las regiones del SNC tales como la habénula media y dorsal, los núcleos interpedunculares y el *locus coeruleus*. Los niveles de expresión son muy pequeños en regiones como la corteza y el hipocampo; estas dos subunidades se encuentran ausentes en el cerebro medio. Son colocalizadas en muchas pero no en todas estas regiones (Sargent, 2000). La expresión del receptor nicotínico α_2 no ha sido estudiada en detalle, pero esta subunidad al parecer se expresa en

muy pocas regiones del cerebro, y su mayor expresión es en los núcleos interpedunculares donde se localizan como receptores nicotínicos $\alpha 2\beta 4$ (Picciotto *et al.*, 2000). La distribución de las subunidades $\alpha 6$ y $\beta 3$ en el SNC es muy limitada, ambas son colocalizadas y se encuentran en niveles altos en las regiones catecolaminérgicas, tales como la sustancia nigra y el área tegmento ventral y en el *locus coeruleus*, en núcleos interpedunculares y en la habénula media (Figura 6). La subunidad $\alpha 5$ también se encuentra relativamente en pocas regiones del Sistema Nervioso Central, y muestra los mayores niveles de expresión en la sustancia nigra, el área tegmento ventral, la habénula media y en ciertas regiones corticales.

En los ganglios autónomos, las subunidades predominantes son $\alpha 3$ y $\beta 4$, pero también $\alpha 7$ constituye otro tipo de receptor nicotínico.

Distribucion de los Receptores Nicotinicos

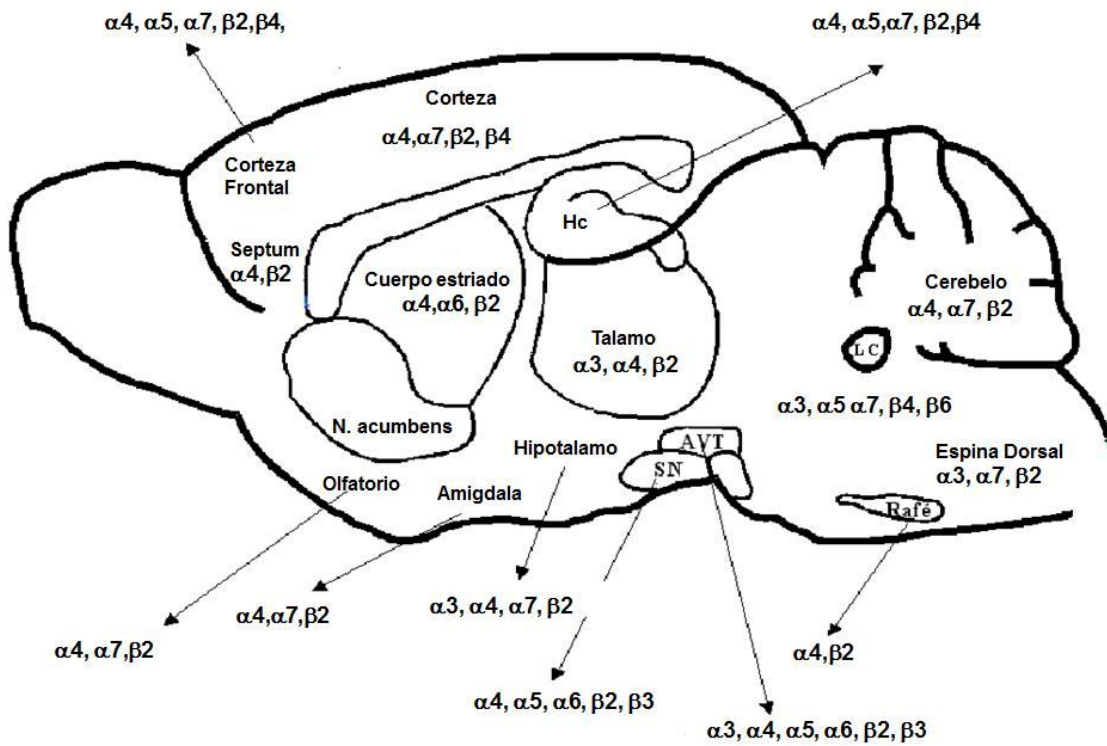


Figura 6. Distribución de los receptores nicotínicos. Esquema del sistema nervioso central del roedor, en donde se ilustra la distribución de los principales subtipos de receptores nicotínicos (Modificada de Picciotto *et al.*, 2001).

2.1.4. Papel funcional

Las subunidades α y β son las que contribuyen en la especificidad farmacológica de los subtipos de receptores nicotínicos (Luetje y Patrick, 1991).

Es importante resaltar que, mientras que el papel funcional, las características estructurales y funcionales de los receptores nicotínicos musculares están bien caracterizados *in vivo*, los del subtipo neuronal están menos caracterizados.

Algunas de las razones son:

Los órganos eléctricos son una fuente concentrada de grandes cantidades de receptores nicotínicos de un solo tipo; en mamíferos únicamente hay dos subtipos de estos receptores, fetal y adulto, los cuales difieren en la sustitución de una sola subunidad; la unión neuromuscular provee una preparación homogénea y fácilmente accesible para estudios electrofisiológicos, histológicos y de desarrollo, con lo que el papel funcional de los receptores nicotínicos del adulto en la transmisión neuromuscular está bien entendida. En contraste los receptores nicotínicos neuronales son encontrados en bajas concentraciones en los tejidos y contienen varios subtipos de receptores, cada uno compuesto por diferentes subunidades. El papel funcional de estos receptores nicotínicos es muy diverso y en algunos casos desconocido (Lindstrom, 2000).

En los receptores nicotínicos neuronales, la mayor parte de la información funcional ha sido obtenida *in vitro*, a partir de su expresión en sistemas heterólogos, principalmente en ovocitos de rana (*Xenopus laevis*) y en menor grado en líneas celulares (Picciotto *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Los receptores nicotínicos expresados en sistemas heterólogos presentan distintos perfiles fisiológicos y farmacológicos.

Estructura	$\alpha 2\beta 2$	$\alpha 2\beta 4$	$\alpha 3\beta 2$	$\alpha 3\beta 4$	$\alpha 4\beta 2$	$\alpha 4\beta 4$	$\alpha 7$
Potencia Agonistas	$D \geq N \geq C \geq A$	$N \geq D > C > A$	$D \geq C \geq N > A$	$D > C \geq N > A$	$C > N > D > A$	$C > N > D \geq A$	$D > C \geq N > A$
Eficacia de Agonistas	$A > N > D > C$	$A > N > D > C$	$D > A > N > C$	$A > D > N > C$	$A > N > D > C$	$A > N > D > C$	$N > A > C > D$
Antagonista	$d-T = DH\beta E$	$d-T < DH\beta E$	$d-T < DH\beta E$	$d-T > DH\beta E$	$d-T < DH\beta E$	$d-T < DH\beta E$	$d-T < DH\beta E$

Tabla 1. Algunas características farmacológicas de los receptores nicotínicos. A=acetilcolina; C=citisina; D=dimetilpiperazina; N=nicotina; d-T=d-tubocuranina; DH β E= dihidro- β -eritroidina (datos tomados de Mihailescu y Drucker-Colin R., 2000).

2.1.5. Patologías

Los receptores nicotínicos ejercen control sobre la liberación de neurotransmisores, es por ello que se encuentran involucrados en la patogénesis de síndromes y enfermedades causados por la alteración de determinados sistemas de neurotransmisores, tales como la depresión y la esquizofrenia. La relación parece ser indirecta y se ha deducido principalmente de los efectos benéficos del tratamiento con nicotina. En otros casos, la relación es más clara.

2.1.5.1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una condición neurodegenerativa progresiva que se ha asociado con la degeneración de neuronas colinérgicas en el cerebro anterior basal que inervan la corteza, amígdala e hipocampo, la cual resulta en disminución de la capacidad de sostener la atención y un deterioro progresivo de las funciones cognitivas superiores e incluso de la pérdida de la memoria (Octave, 1995). Se ha encontrado una disminución de receptores nicotínicos en diferentes regiones cerebrales (corteza temporal y entorrinal, giro parahipocampal), predominantemente asociada a la pérdida de subunidad $\alpha 4$ (Court *et al.*, 2001), deficiencia que se ha relacionado con dificultad en las capacidades de aprendizaje espacial y en la memoria relacionada con tareas en ratas hipertensas que muestran déficit en la función cognitiva (Gattu *et al.*, 1997). Por otro lado, los depósitos cerebrovasculares de proteína β -amiloide característicos de la EA han sido asociados con los receptores nicotínicos que contienen a la subunidad $\alpha 7$ (Wang *et al.*, 2000). El tratamiento con nicotina es efectivo en revertir el déficit de atención (Lawrence y Sahakian, 1998). En estudios post mortem en tejido cerebral de sujetos con EA se ha observado una reducción de los receptores nicotínicos en la corteza (Smith y Giacobini, 1992).

2.1.5.2. Enfermedad de Parkinson

La Enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno motor, caracterizado por temblores en reposo, rigidez, dificultades en los reflejos posturales y carencia de expresión facial. Algunos estudios han mostrado que los fumadores tienen la mitad del riesgo de diagnosticarse con EP que los no fumadores (Morens *et al.*, 1995). Por otro lado, la administración de nicotina en combinación de parche y goma de mascar reduce significativamente la rigidez, el temblor, el pensamiento desorganizado y la depresión en pacientes no fumadores con EP (Fagerstrom *et al.*, 1994).

Se ha encontrado una disminución de receptores nicotínicos en el cortex cerebral de pacientes con EP, principalmente los receptores que contienen las subunidad $\alpha 4$ y $\alpha 7$ (Burghaus *et al.*, 2003).

2.1.5.3. Trastorno por déficit de atención

El trastorno por déficit de atención (TDA), con o sin hiperactividad, es un trastorno psiquiátrico caracterizado por sobre reactividad, distractibilidad e impulsividad (Barkley, 1990). Estudios sugieren que la administración de nicotina mejora la atención (Warburton *et al.*, 1992)

2.1.5.4. Esquizofrenia

Los síntomas de la esquizofrenia comprenden conductas gravemente organizadas o comportamiento catatónico, lenguaje desorganizado, ideas delirantes y experiencias perceptuales inusuales.

Se ha determinado que 61-90% de los sujetos con esquizofrenia fuman regularmente (Poirier *et al.*, 2002).

En la esquizofrenia la supresión de la respuesta auditiva evocada ha sido asociada con un defecto o una disminución en la expresión de receptor nicotínico $\alpha 7$ en el hipocampo y en el núcleo talámico reticular (Leonard *et al.*, 1998). El tejido del hipocampo de esquizofrénicos es deficiente en receptores nicotínicos sensibles a α -bungarotoxina (Freedman *et al.*, 1995) y en el ARNm para la síntesis de la subunidad $\alpha 7$ (Martin-Ruiz *et al.*, 2003).

2.1.5.5. Síndrome de Gilles de la Tourette

El síndrome de Gilles de la Tourette (SGT) es un trastorno que se inicia en la niñez y se caracteriza por tics motores y verbales espontáneos e incontrolables, así como aparición frecuente de hiperactividad, ansiedad, fobias o trastornos obsesivo-compulsivos

El SGT se ha asociado comúnmente con conductas obsesivo-compulsivas, TDA, conducta agresiva e incapacidad para aprender (Harris *et al.*, 1995). Algunos estudios sugieren que la estimulación de los receptores nicotínicos reduce los tics. Pruebas clínicas piloto indican que la nicotina, tanto en parche como en goma de mascar, pueden aminorar los síntomas del SGT en adolescentes no fumadores sin control satisfactorio por neurolepticos (Sanberg *et al.*, 1997).

2.1.5.6. Ansiedad

La ansiedad se caracteriza por incrementos en la presión sanguínea y en la actividad cardíaca, aumento en la sudoración, así como problemas para mantener la atención y un marcado estado de aprehensión. La fatiga motora y el insomnio también son comunes. Estudios que han utilizado modelos conductuales de ansiedad en roedores también sugieren que la nicotina puede tener efectos similares a los ansiolíticos y que receptores nicotínicos, en particular las subunidades $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ están involucradas (Piccioto *et al.*, 2002).

2.1.5.7. Depresión

La depresión es un trastorno con una variedad de síntomas de una prevalencia estimada de 15% en mujeres y 8% en hombres. La depresión es la principal causa de suicidios.

Existe evidencia de que individuos depresivos fuman más que la población normal (Poirier *et al.*, 2002) y dejar de fumar está asociado con la depresión en individuos con historial de depresión.

2.1.5.8. Epilepsia

La epilepsia autosómica dominante del lóbulo frontal (EADLF) es una epilepsia parcial que causa breves convulsiones, las cuales ocurren durante el sueño nocturno y que frecuentemente se confunden con pesadillas, aunque muchos pacientes también sufren algún grado de convulsiones generalizadas violentas. La EADLF es una enfermedad genética con anomalías localizadas

en el cromosoma 20q13.2-q13.3 el cual contiene el gen que codifica para la subunidad $\alpha 4$ (Phillips *et al.*, 1995).

Cuando se expresa la subunidad alterada combinada con subunidades $\beta 2$ *in vitro*, se forma un receptor mutado que presenta una permeabilidad reducida al Ca^{+2} , una menor capacidad de apertura y una lenta recuperación después del estado de desensibilización (Raggenbass y Bertrand, 2002).

Se ha observado que mutaciones similares en la posición 250 en la subunidad $\alpha 7$ en ratones inducen un incremento en la sensibilidad de los receptores nicotínicos que contienen a esta unidad, que se traduce en un mayor número de crisis a menores concentraciones de nicotina (Marks *et al.*, 1989).

2.1.5.9. Síndrome de Down

Sujetos con síndrome de Down muestran diversos tipos de alteraciones cognitivas. Estudios neuropatológicos y neuroquímicos han revelado semejanzas entre los sujetos con síndrome de Down y sujetos con EA y los déficit colinérgicos son los datos más consistentes. La administración de nicotina vía parches transdérmicos tiene beneficios cognitivos agudos en los sujetos con síndrome de Down (Seidl *et al.*, 2000).

2.2. Género *Erythrina*

El género *Erythrina* pertenece a la Familia de las Fabáceas (Leguminosas). El nombre hace referencia al color prevaleciente de las flores y deriva del griego *erythros* que significa rojo. Por esta misma característica se le ha llamado el árbol coralino. A diferencia de muchos otros géneros de árboles de leguminosas, *Erythrina* es pantropical, consta de 112 especies, 70 neotrópicas, 31 africanas y 11 asiáticas (Allen y Allen, 1981; Fabián y Germishhuizen, 1997; Neill, 1993). Sólo la especie *Erythrina fusca* se encuentra tanto en el viejo como en el nuevo mundo. Este género tiene probablemente su origen en Sudamérica, y debido a la habilidad que poseen las semillas de flotar y de mantener la viabilidad después de largos periodos de inmersión en agua salina, probablemente le proporcionó a la especie ancestral la capacidad de invadir ambientes costeros o estuarinos, dando como resultado su distribución por todo el mundo (Figura 7). La gran diversidad ecológica y morfológica es producto de la polinización por aves (Neill, 1988) y una marcada capacidad a hibridarse. El número de cromosomas en el género es de 21, compartido por todas las especies del género, y no se presenta en otras leguminosas.

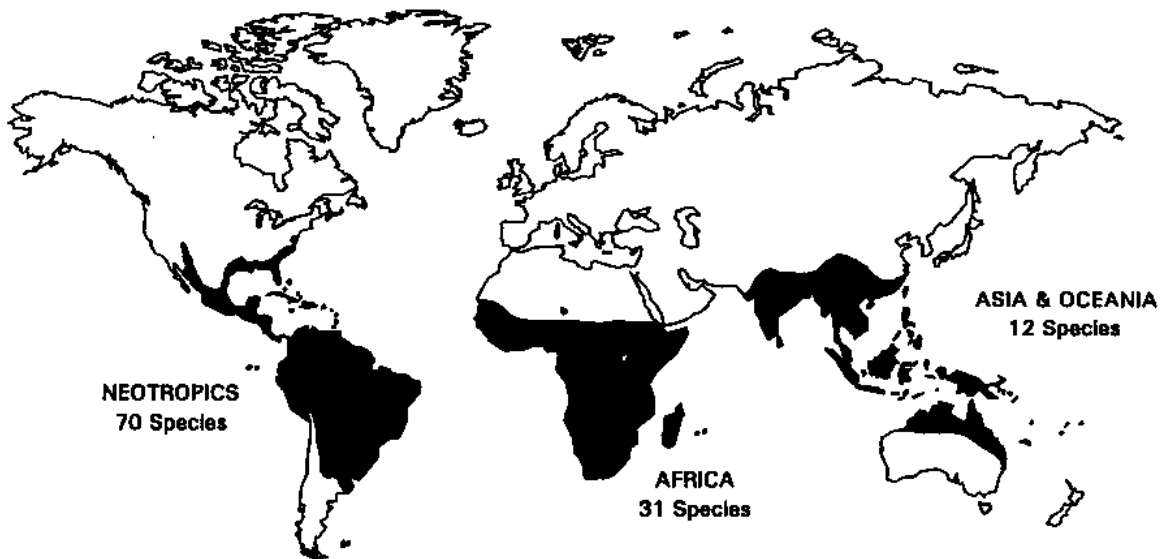


Figura 7. Distribución mundial de *Erythrina* (Neill 1993)

Erythrina americana

Familia: Leguminosae (Fabaceae)

Nombres comunes: zompantle o colorin

Distribución: Esta especie se encuentra en tierras bajas y elevaciones moderadas (1000-2100 m). Estado de México, Veracruz, Hidalgo, Morelos, Guerrero, Puebla y Oaxaca.

Descripción botánica: Es un árbol de 4 a 5 metros, extendido, corteza lisa y café. Tiene espinas en las ramas y espinas cónicas y anchas en el tronco. Las hojas son alternadas y trifoliadas con tres puntas, folíolos rómbico-ovalados de 7 a 22 cm de largo y ancho (García *et al.*, 2001)

2.2.1. Taxonomía

Género de árboles y arbustos, rara vez plantas herbáceas, generalmente son caducifolios y con las ramillas espinosas. Sus hojas son pinadas trifoliadas. Las flores son generalmente de color rojo escarlata en racimos terminales (Figura 8). Las brácteas y bractéolas son muy pequeñas o ausentes. Presentan un cáliz truncado, que tiene alrededor de cinco dientes. La corola tiene un estandarte grande, plegado y ocultando la quilla y las alas antes de que la flor se desarrolle totalmente o extendido y mostrando el resto de los pétalos. Su androceo posee 10 estambres, nueve de los cuales están unidos y uno libre. Presenta un fruto pedunculado, linear, constreñido o sinuoso entre las semillas. Sus semillas son ovoides de 0.7 a 1 cm de longitud (García-Mateos 2001).

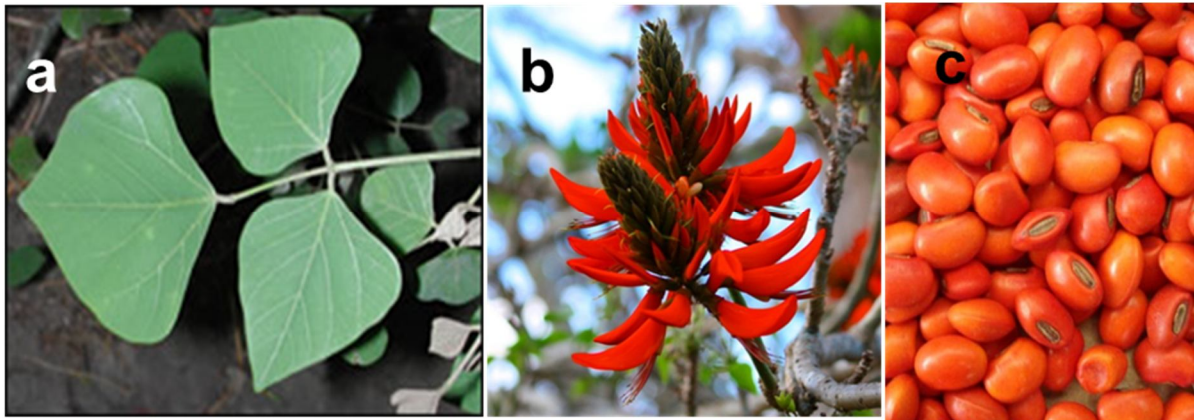


Figura 8. *Erythrina americana*. a) hojas trifoliadas, b) flores rojas escarlata, en racimos terminales, (c) semillas ovoides de 0.7-1 cm.

2.2.2. Química

La mayoría de los estudios se han concentrado en examinar las semillas, las cuales regularmente contienen el 0.1% de los alcaloides, aunque también se han aislado alcaloides de hojas, tallos, corteza, vaina y flores de las especies de *Erythrina* (Sánchez *et al.*, 2001), así como en callo y células en suspensión mediante técnicas de cultivo vegetales (García *et al.*, 1999 y San Miguel *et al.*, 2007).

E. americana ha sido estudiada extensivamente debido a su alto contenido de alcaloides en las semillas con actividad farmacológica (Aguilar y Espejo, 1981). Soto y colaboradores (1989; 1994) identifican como un componente especial en *E. americana* una serie de alcaloides espirocíclicos-isoquinólicos que se encuentran en toda la planta (García *et al.*, 1998).

Barrera (1958) y Rebolledo (1970) emprenden en México los estudios de aislamiento. Después, Hargreaves y colaboradores en 1974 describen la presencia de erisodina, erisovina y α y β -eritroidina en extractos de semillas. En 1999 García y colaboradores describen la obtención de alcaloides tetracíclicos con un perfil de alcaloides oxigenados 8-oxo-erisovine y 11-hidroxierisotinona.

2.2.3. Actividad biológica de *E. americana*

Las acciones biológicas estudiadas experimentalmente con mayor frecuencia en el género *Erythrina* son: actividad antibacteriana (31%), efecto citotóxico (9%), actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética (7%), antifúngica (5%), entre otras (Pino *et al.*, 2004). Generalmente se obtienen tres

fracciones crudas de alcaloides de semillas de *Erythrina americana*: alcaloides libres en hexano, libres en metanol y alcaloides liberados. La evaluación farmacológica de estas fracciones en ratas mostró que, administradas en una dosis de 3 mg/kg, disminuyen el comportamiento agresivo, comparable con el control positivo diazepam (Garín *et al.*, 2000). García y colaboradores (2000) observaron que el derivado dihidro es más potente que la β -eritroidina sobre el comportamiento agresivo en ratas. Por otra parte la fracción de alcaloides liberados resultó ser más tóxica que las fracciones de alcaloides libres y metanólicos sobre las especies *Daphnia magna* (crustáceo), *Artemia salina* (crustáceo), *Bacillus cereus* (bacteria) y *Panagrellus redivivus* (nematodo), principalmente por la presencia de los alcaloides erisopina, erisodina y erisovina (García *et al.*, 2000). En larvas de *Culex quinquefasciatus*, la fracción de alcaloides libres metanólicos mostró alta mortalidad por encima de la fracción de alcaloides liberados; también el alcaloide β -eritroidina, aislado de la fracción de alcaloides libres, fue más tóxico que erisovina (García *et al.*, 2004). Sobre hongos fitopatógenos, erisovina posee un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Penillium sp.*, *Monilia fructicola* y *Trichoderma harzianum*; la dosis de 0.8 mg/mL presentó la actividad antimicótica más alta (Ibarra *et al.*, 2009). El extracto crudo de plantas de *E. coralloides* mostró efecto antimicótico sobre las especies antes mencionadas, a excepción de *T. harzianum*, que no fue estudiada (Soto y San Miguel, 2006).

Se trató a carpas (*Cyprinus carpio*) con extracto liposoluble y extracto hidrosoluble de alcaloides de flores de colorín, obteniendo un efecto inmovilizador,

pero con alta mortalidad en dosis mayores (Vargas, 1988; citado por Auro de Ocampo y Jiménez, 1993).

2.2.4. Farmacología

En 1937, Altamirano y colaboradores reportaron que los extractos de *E. americana* poseen un efecto parecido al del curare; en ese mismo año Folkers y Major describen el aislamiento del primer alcaloide cristalino, biológicamente activo y le dan el nombre de eritroidina, posteriormente se demuestra que este compuesto es una mezcla de dos isómeros α y β (Hargreaves *et al.*, 1974; Lozoya, 1982).

β -eritroidina y sus derivados contienen un sistema de anillos y presentan actividad curariforme, la acción paralítica es periférica y el extracto es efectivo reduciendo las convulsiones en varios animales. El principal efecto fisiológico es el bloqueo de la unión neuromuscular, con una acción antagonizada por anti-acetilcolinesterasa (Decker, 1995; Megirian *et al.*, 1955). Este compuesto es semejante a la d-tubocuranina, pero 10 veces más efectivo. Sin embargo, las eritroidinas son efectivas oralmente en el SNC produciendo, además, un efecto relajante en la transmisión muscular actuando en las neuronas internucleares de la espina dorsal, provocando una baja en la presión sanguínea, mientras que dosis altas puede paralizar la respiración. La acción paralizante de las eritroidinas no es tan intensa y prolongada como el curare, pero el margen de seguridad es mayor, por ello fueron utilizadas en la medicina clínica y en anestesia como sustitutos del

curare. Tal como el curare, las eritroidinas son anestésicos e hipnóticos (Craig, 1955; Soto, 1989).

Por otro lado, extractos crudos de *E. americana* reducen el comportamiento agresivo en ratas (Garín *et al.*, 2000). También se ha observado que el derivado dihidro es más potente que β -eritroidina, ya que dihidro- β -eritroidina tiene un efecto calmante más potente que la β -eritroidina (García *et al.*, 2000).

Otro alcaloide presente en *Erythrina* es erisodina, que actúa como antagonista de los receptores nicotínicos subtipo $\alpha 4\beta 2$ y más potente que dihidro- β -eritroidina (Decker 1995).

Además de erisodina, otros alcaloides como erisovina, α , β -eritroidina y erisopina están presentes en *E. americana* (García *et al.*, 1996). Un aspecto importante a señalar es que si bien los alcaloides de *Erythrina*, a determinadas dosis también impiden el paso de impulsos nerviosos provocando una parálisis de los músculos no se presentan efectos colaterales dañinos en dosis ligeramente mayores a las del curare y que además son efectivos cuando se administran por vía oral (Craig, 1981).

Estudios realizados por Decker y colaboradores (1995) mostraron que el alcaloide erisodina tiene mucho más afinidad a receptores de acetilcolina nicotínicos de tipo neuronal que la dihidro- β -eritroidina, indicando que dicha afinidad se incrementa siete veces más para el sitio de enlace nicotínico marcado con [^3H]($-$)-citisina.

Dado que antes de aislar la erisodina no se contaba con un antagonista más selectivo, varios investigadores utilizaron dihidro- β -eritroidina como

antagonista de receptores nicotínicos para poder determinar el papel funcional de estos receptores. Sin embargo, en tales estudios no se puede excluir totalmente la participación de otros subtipos de receptores nicotínicos ya que dihidro- β -eritroidina se une tanto al subtipo $\alpha 4\beta 2$ como a $\alpha 7$ (Cheeta, *et al.*, 2001).

2.2.5. Estructura de los alcaloides de *Erythrina*

Alcaloide

La palabra alcaloide fue utilizada por primera vez por W. Meissner en el primer cuarto del siglo XIX (1819) para designar algunos compuestos activos que se encontraban en los vegetales y que poseían carácter básico.

También es una sustancia orgánica que contiene en su estructura nitrógeno, es de origen natural, de mayor o menor grado de basicidad, su distribución es restringida y puede tener actividad biológica, sus estructuras pueden ser desde muy simples hasta muy complejas y son encontradas en alrededor de 20% de las especies vegetales (Citado por Bonilla 2013).

Los alcaloides de *Erythrina* son de tipo isoquinolínico, caracterizados por su única estructura espiroamina tetracíclica (Reimann, 2007), que es un esqueleto eritrinano (Figura 9).

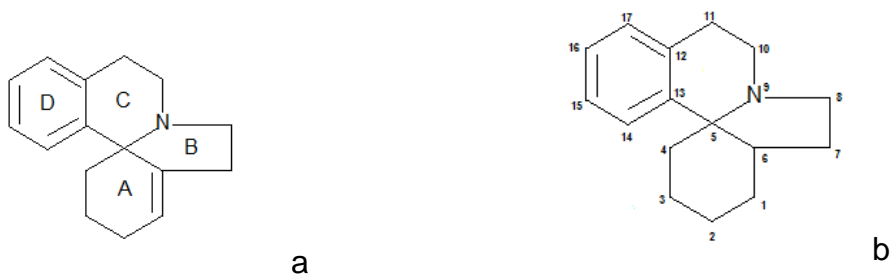


Figura 9 . Alcaloides de *Erythrina*. a) esqueleto eritranano y b) esquema numerado del esqueleto de los alcaloides de *Erythrina* (modificado de Bonilla, 2013).

Se clasifican de acuerdo a su estructura en 3 grupos: diénicos, alquénicos y lactónicos.

Los alcaloides diénicos contienen un sistema dieno conjugado en los anillos A y B (Figura 10).

Alcaloide	R ₁	R ₂	R ₃
Erisodina	H	Me	Me
Erisopina	H	H	Me
Erisovina	Me	H	Me
Erisotrina	Me	Me	Me
Eritralina		-CH ₃ -	Me
Eritravina	Me	Me	H
Erisonina	H	Me	H
Erisolina	Me	H	H
Eritrocarina		-CH ₂ -	H

Figura 10. Estructura de los alcaloides diénicos (modificado de Bonilla, 2013).

11). Los alcaloides alquénicos tienen una Insaturación 1, 2 en el anillo A (Figura 11).

Alcaloide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Eritratidina	Me	Me	OH	H
Erisotina	H	Me	OH	H
11-metoxietitratidina	Me	Me	OH	OMe

Figura 11. Estructura de los alcaloides alquénicos (modificado de Bonilla, 2013).

Los alcaloides lactónicos tienen, como su nombre lo indica, una lactona en lugar del anillo aromático (Figura 12).

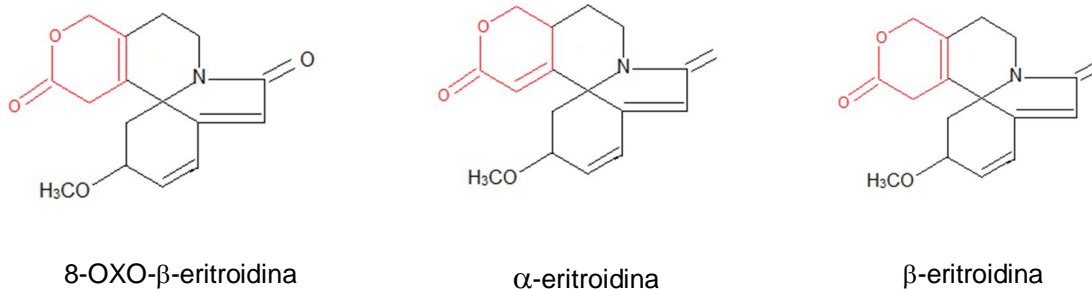


Figura 12 . Estructura de los alcaloides lactónicos (tomado de Bonilla 2013).

3. HIPÓTESIS

Dada la similitud en estructura química que presenta el alcaloide erisopina con erisodina y DH β E, (Figura 10) sería probable que erisopina también presente afinidad por los receptores nicotínicos. De ser así, podría considerarse una sustancia potencialmente útil para estudios farmacológicos de receptores nicotínicos.

Es por ello que el presente trabajo tiene como objetivo explorar el efecto del alcaloide erisopina en los receptores nicotínicos de rata α 4 β 4.

4. OBJETIVOS

4.1. GENERAL

- ❖ Evaluar los efectos del alcaloide erisopina aislado de semillas de la especie *Erythrina americana* sobre los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$.

4.2. PARTICULARES

- ❖ Obtención del material genético que codifica para las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 4$, δ y γ de los receptores nicotínicos de acetilcolina.
- ❖ Expresar los receptores nicotínicos musculares, $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$ y neuronales, $\alpha 4\beta 4$ en la membrana de ovocitos de *Xenopus laevis*.
- ❖ Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de erisopina en la corriente inducida por acetilcolina.
- ❖ Determinar si el efecto de erisopina sobre los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ son de potenciación, inhibición o nulos. En caso de que sí presente efecto, determinar la concentración que presenta el 50% del efecto (potenciación o inhibición: EC_{50} ó IC_{50} , respectivamente).
- ❖ Proponer un posible mecanismo de acción de erisopina sobre los receptores nicotínicos.

5. MATERIALES Y MÉTODO

Se expresaron los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$, en la membrana del ovocito de la rana *Xenopus laevis*, mediante la inyección de una mezcla de los ARN que codifican para las subunidades de cada subtipo de receptor de rata en proporciones equimolares. Para lo cual se siguieron las metodologías descritas a continuación.

5.1. Obtención de ARN codificante para cada subunidad del receptor nicotínico.

Para obtener el ARN que codifica para cada subunidad del receptor nicotínico se emplearon las siguientes herramientas de biología molecular:

- Bacterias TB1 calcio competentes.
- Transformación de bacterias con plásmido y siembra de colonias en medio LB líquido para realizar MAXIPREPS (Qiagen).
- Extracción de ADN plasmídico mediante MAXIPREPS (extracción y purificación de ADN).
- Cuantificación de ADN por espectrofotometría.
- Linearización de ADN con enzimas de restricción.
- Purificación de ADN linearizado por el método de extracción fenol-cloroformo.
- Transcripción *in vitro*.
- Purificación de ARN por el método de extracción fenol-cloroformo.

- Cuantificación de ARN por espectrofotometría.

5.1.1. Bacterias TB1 calcio competentes

Materiales

1. Bacterias TB1
2. Medio LB (Luria Bertani) sin ampicilina.
3. Cloruro de calcio (CaCl_2).
4. Glicerol.

Procedimiento

Se cultivaron las bacterias TB1 en 200 mL de medio LB, incubándolas a 37°C con agitación continua durante 24 horas. Después de este tiempo se determinó la absorbancia; una vez alcanzada una absorbancia cercana a 400 nm (que indica un crecimiento óptimo de las bacterias) el cultivo se centrifugó a 3,540 rcf durante 5 min y el sobrenadante fue decantado. Las bacterias contenidas en la pastilla fueron resuspendidas en 10 mL de CaCl_2 a 4°C con ayuda de un vortex y se incubaron por 30 min a 37°C. El cultivo fue centrifugado nuevamente a 3,540 rcf durante 5 min, se recuperó la pastilla y se resuspendió en 2 mL de CaCl_2 a 4°C. Finalmente, las alícuotas que se utilizaron inmediatamente fueron almacenadas a 4°C; el excedente fue almacenado a -80°C en glicerol en relación 3:1 (15 mL de bacterias por 5 mL de glicerol), el cual fue utilizado en experimentos posteriores.

5.1.2. Transformación de bacterias

Los cDNA clones de los receptores nicotínicos fueron proporcionados por los Doctores J. Boulter y S. Heinemann.

Materiales

1. Alícuotas de bacterias TB1 calcio competentes.
2. Plásmidos con el ADN de interés incorporado.
3. Medio LB sin ampicilina.
4. Baño de agua a 42°C.
5. Agitador de bacterias a 37°C.
6. Cajas de Petri preparadas con medio de cultivo LB con ampicilina
7. Hielo.

Procedimiento

Se descongeló una alícuota de bacterias competentes en hielo y se añadieron 5 ng del ADN de interés (plásmido con el ADNc que codifica para las subunidades de receptores nicotínicos), se agitó la solución con unos ligeros golpes y fue incubada en hielo durante 30 min. Esta mezcla se colocó en un baño de agua a 42°C durante 50 segundos, posteriormente fue colocada en hielo por 2 min (este cambio de temperatura permite que el ADN ingrese a la célula). Se añadieron 200 μ L de medio LB sin ampicilina y se incubó a 37°C durante 45 min,

con agitación continua. Pasado este tiempo de incubación, se tomaron 50 μ L y se colocaron sobre una caja Petri con medio LB con ampicilina, la solución fue dispersada uniformemente (en medio estéril). Se dejó secar el líquido por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente la caja Petri con la siembra fue incubada a 37°C durante 16 horas con el agar hacia arriba. Después de este tiempo se obtuvo el crecimiento de colonias blancas de un solo tipo (resistentes a ampicilina y con el ADN de interés incorporado).

5.1.3. Multiplicación del plásmido

Materiales

1. Bacterias transformadas.
2. Medio LB líquido con ampicilina.

Procedimiento

Se tomó una colonia de bacterias transformadas, con un asa bacteriológica y fue sembrada en 200 mL de medio LB líquido con ampicilina en un matraz Erlenmeyer. Se incubó a 37°C con agitación continua de 200 rpm, durante 16 horas. Al término de este tiempo, se colocó en hielo para detener el crecimiento.

5.1.4. Obtención de ADN plasmídico mediante método de lisis alcalina.

De la mezcla anterior, se purificó el ADN por medio del estuche de MAXIPREPS (Qiagen, Plasmid Maxi Kit).

Materiales

1. Isopropanol.
2. Agua esterilizada.
3. Soluciones proporcionadas en el estuche.

Amortiguador	Composición
Amortiguador P1 (amortiguador para resuspender).	50 mM Tris-Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/mL Rnasa A.
Amortiguador P2 (amortiguador de lisis).	200 mM NaOH, 1% SDS (p/v).
Amortiguador P3 (amortiguador de neutralización).	4 M acetato de potasio, pH 5.5.
Amortiguador QBT (amortiguador de equilibrio).	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v); 0.15% Tritón X-100 (v/v).
Amortiguador QC (amortiguador de lavado).	1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (v/v).
Amortiguador QF (amortiguador de elución).	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (v/v).

Procedimiento

El cultivo de bacterias se centrifugó a 2,601 rcf durante 20 min a 4°C. Al terminar de centrifugar se decantó el sobrenadante y la pastilla resultante se resuspendió en 10 mL de amortiguador P1 al que previamente se le añade la ARNasa. Posteriormente, se lisaron las células agregando 10 mL del amortiguador P2 y se mezcló invirtiendo el tubo 8 veces. Se dejó a temperatura ambiente durante 5 min, pasado este tiempo se agregarán 10 mL de amortiguador P3 y se mezcló nuevamente invirtiendo el tubo 8 veces. La mezcla fue dejada en hielo durante 20 min. Al término de este tiempo se centrifugó a 2,601 rcf durante 30 min a 4°C.

Aproximadamente 10 min antes de que se terminara de centrifugarse la muestra, se preparó una columna de separación aplicando 10 mL de amortiguador QBT y se esperó a que pasará todo el líquido.

El sobrenadante resultante de la centrifugación se filtró a través de una gasa limpia y fue depositado en otro tubo. Este líquido limpio se colocó en la columna previamente preparada y se esperó a que pasara totalmente por la columna. Al terminar se agregaron 30 mL del amortiguador QC y posteriormente se agregaron otros 30 mL del mismo amortiguador QC para lavar por segunda vez. Después de estos dos lavados, se cambió la columna a un tubo de recolección estéril y se añadieron 15 mL de amortiguador QF para eluir la muestra. A este líquido se le agregaron 15 mL de isopropanol, se mezcló y se mantuvo a -20°C por 20 min (en este momento la muestra previamente etiquetada puede permanecer almacenada por tiempo indefinido).

Posteriormente la muestra fue centrifugada a 7,224 rcf durante 30 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y a la pastilla se añadieron 5 mL de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 7,224 rcf durante 15 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se invirtió el tubo durante 15 min para eliminar el exceso de líquido. La pastilla fue resuspendida en 300 μ L de agua estéril y se cuantificó en el espectrofotómetro.

Finalmente, el ADN total fue transferido a un tubo tipo Eppendorf y se le etiquetó con nombre, concentración y fecha, ésta fue almacenada a -20°C por tiempo indefinido.

Nota: El ADN obtenido es circular.

5.1.5. Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro

Materiales

1. Agua estéril.
2. Muestra de ADN.
3. Espectrofotómetro.

Procedimiento

Se encendió el espectrofotómetro previamente y se esperó a que se calibrara. Se seleccionó la opción que corresponde a la lectura de ácidos nucleicos (ADN). Se pusieron 400 μ L de agua estéril en la celda de referencia, ésta se colocó en el carril correspondiente y se tomó la lectura.

Para medir la absorbancia de la muestra, se tomó 1 μ L de la muestra de ADN total y fue diluida en 399 μ L de agua estéril, la lectura fue tomada a 260 nm,

una vez que se obtuvo el valor de absorbancia se utilizó la siguiente fórmula para obtener la concentración de ADN.

$$\text{concentración de ADN} = \frac{\text{valor de absorbancia} \times 50 \times \text{dilución (400)}}{1000}$$

(unidades en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

Los valores típicos de absorbancias: (obtenido de nuestros cuadernos de protocolos)

A 260 nm: 0.151

A 280 nm: 0.076

El cociente A_{260}/A_{280} siempre fue cercano a 2, cuando no ocurría esto, la muestra fue desechada.

5.1.6. Linearización de ADN con enzimas de restricción

Materiales

1. Enzimas de restricción específicas para cada subunidad:

α 4: EcoRI

α 2: HindIII.

β 2: HindIII.

β 4: XhoI

2. Agua esterilizada.

3. Agarosa.

Procedimiento

Con base en la concentración del ADN extraído por el método de Qiagen, se tomaron 50 μg de ADN, los cuales fueron linearizados con 0.2 μL de enzima por cada μg de ADN (2 unidades de enzima por cada μg de ADN = 10 μL). Se añadió el volumen del amortiguador correspondiente a la enzima (1X) y se agregó agua estéril necesaria para obtener un volumen total de 60 μL . Se mezcló y se centrifugó brevemente para llevar la mezcla al fondo y se incubó a 37°C durante 1 hora y 30 min.

Para asegurarse de que la muestra se había linearizado, se elaboró un gel con 0.5 μg del ADN linearizado; en el caso donde el ADN no fuerá linearizado, se añadió más enzima y se incubó por 1 hora más.

Nota: el orden en que se agregaron los reactivos al tubo de reacción fue el siguiente: ADN, agua, amortiguador y finalmente la enzima (se mantuvo en hielo hasta antes de añadirse la enzima).

Ejemplo para linearizar la muestra de ADN con enzimas de restricción.

Fórmula $v = m/c$

Donde: v = volumen, m = masa = 50 μg , c = concentración de ADN total para la subunidad $\beta 4 = 1.42 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, $v = 50 \mu\text{g} / 1.42 \mu\text{g}/\mu\text{L} = 35.21 \mu\text{L}$

ADN	35.21 μL	
Xho I	10 μL	(2 U/ μg ADN \times 50 μg ADN / 10 U/ μL = 10 μL)
Amortiguador	6 μL	(1 μL por cada 10 μL del volumen total)
Agua	8.79 μL	(aforar a un volumen final de 60 μL)

Total:	60 μL	

5.1.7. Purificación de ADN linearizado por el método de extracción fenol-cloroformo

Materiales

1. Agua tratada con DEPC 0.1%
2. Amortiguador TE pH 8.0 en agua tratada con DEPC 0.1%.
3. Solución SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1).
4. Acetato de sodio 3M pH 6.0.
5. Etanol al 100%.
6. Etanol al 70%.

Procedimiento

La mezcla de reacción del ADN linearizado se llevó a un volumen de 100 μL con agua desionizada estéril (DEPC 0.1%). Se mezcló, se añadieron 50 μL de fenol saturado (con amortiguador TE pH 8.0) y 50 μL de solución SEVAG y se agitó suavemente 20 segundos. Se centrifugó a temperatura ambiente por 3 min a 7,224 rcf. Se recuperó la fase acuosa (muestra de interés) teniendo cuidado de no mezclar la muestra con el fenol, la muestra fue colocada en otro tubo. Se añadieron 100 μL SEVAG y se agitó suavemente por 20 segundos. Se centrifugó nuevamente por 3 min a 7,224 rcf a temperatura ambiente (este paso se puede repetir para eliminar contaminación por fenol).

Una vez obtenida la fase acuosa, se añadió acetato de sodio 3 M pH 6.0 y etanol 100% enfriado en hielo (0.5 y 2.5 del volumen total, respectivamente). Se mezcló con la ayuda de un vortex durante 1 min y se incubó a -70°C durante 20 min.

Al término de este tiempo, se centrifugó a 7,224 rcf a 4°C durante 20 min, se decantó con cuidado y a la pastilla se le añadió 1 mL de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar a 7,224 rcf por 20 min a 4°C , el sobrenadante fue decantado y se dejó evaporar el exceso de etanol. La pastilla fue resuspendida en 50 μL en agua tratada con DEPC 0.1% para tener una concentración final de aproximadamente $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Finalmente, se realizó la lectura en el espectrofotómetro siguiendo los pasos para la lectura del ADN total. Obtenido el ADN linearizado se etiquetó con nombre concentración y fecha, para ser almacenado a -20°C por tiempo indefinido.

5.1.8. Transcripción *in vitro*

Por medio de este método se obtuvo el ARN a partir del ADN linearizado.

Es este ARN el que fue inyectado en los ovocitos.

Materiales

La mezcla de reacción es la siguiente:

Reactivo	Cantidad
<i>Amortiguador de transcripción</i>	10 μ L
<i>DTT 100 mM</i>	5 μ L
<i>Mezcla de nucleótidos*</i>	5 μ L
<i>Análogo del cap 5 mM</i>	5 μ L
<i>ADN linearizado</i>	10 μ g
<i>RNasin</i>	1.25 μ L
<i>Polimerasa (SP6 .T3, T7)**</i>	40 unidades
<i>Agua libre de RNasas</i>	Hasta alcanzar 50 μ L

* La mezcla de nucleótidos se realizará previamente añadiendo:

2 μ L de ATP, 2 μ L de UTP, 2 μ L de CTP y 1.5 μ L de GTP.

** Polimerasa

SP6 (500 U) 2.7 μ L

T3 (1000 U) 1.35 μ L

SP6 fue utilizado para α 4, β 2, y para los musculares (γ , δ).

T3 fue utilizado para β 4

Procedimiento

Los reactivos fueron descongelados y llevados a temperatura ambiente (amortiguador de transcripción, DTT, mezcla de nucleótidos y el "capping"). Una vez alcanzada la temperatura ambiente se adicionaron según el orden en la lista.

Las enzimas (RNasin y polimerasa) se transportaron en hielo justo antes de ser añadidas. Una vez adicionados todos los reactivos, se mezcló y se centrifugó por 20 segundos. La mezcla fue incubada a 37°C durante 2 horas. Al término de este tiempo se añadió la misma cantidad de polimerasa y se incubó por 2 horas más. Finalmente, se agregó una unidad de DNasa por cada μg de ADN linearizado y se incubó durante 15 min. El transcrito obtenido fue purificado por el método de extracción fenol-cloroformo.

5.1.9. Purificación de ARN por el método de extracción fenol-cloroformo

Materiales

1. Agua DEPC 0.1%
2. Amortiguador TE pH 4.5 en agua DEPC 0.1%.
3. Solución SEVAG (cloroformo: alcohol isoamílico, 24:1).
4. Acetato de amonio 7.5M.
5. Etanol al 100%.
6. Etanol al 70%.

Procedimiento

La mezcla de reacción del ARN se llevó a un volumen de 100 μL con agua DEPC al 0.1%. Se mezcló y se le agregaron 50 μL de fenol saturado (con amortiguador TE pH 8.0) y 50 μL de solución SEVAG, se agitó suavemente durante 20 segundos. Se centrifugó por 3 min a 10,403 rcf a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa (muestra) con cuidado para evitar que se mezcle con el fenol y fue transferida a otro tubo. Se le agregaron 100 μL SEVAG y

se agitó suavemente por 20 segundos. Se centrifugó nuevamente durante 3 min a 10,403 rcf a temperatura ambiente (este paso se puede repetir para eliminar contaminación por fenol).

Una vez obtenida la fase acuosa limpia, se añadió acetato de amonio 7.5 M y etanol al 100% enfriado en hielo (0.5 y 2.5 del volumen total, respectivamente). Se mezcló con la ayuda de un vortex durante 1 min y se incubó la muestra a 70°C durante 20 min.

Al término de este tiempo, se centrifugó a 10,403 rcf a 4°C por 20 min, se decantó el sobrenadante y a la pastilla se le añadió 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente a 10,403 rcf por 20 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó evaporar el exceso de etanol. La pastilla fue resuspendida en 5 µL en agua DEPC 0.1% a temperatura ambiente. Finalmente se cuantificó el ARN en el espectrofotómetro y fue almacenado a -80°C por tiempo indefinido.

5.1.10. Cuantificación de ARN en el espectrofotómetro

Materiales

1. Agua estéril.
2. Muestra de ARN.
3. Espectrofotómetro.

Procedimiento

Se encendió el espectrofotómetro previamente y se esperó a que se calibre. Se seleccionó la opción correspondiente a lectura de ácidos nucleicos (ARN) y se leyó a una absorbancia de 260 nm. El control fue tomado con 400 µL de agua

estéril que fue colocado en la celdilla que corresponde al blanco y se tomó la lectura. Posteriormente la absorbancia de la muestra fue medida, para la cual se tomó 1 μL de la muestra de ARN y fue diluida en 399 μL de agua estéril.

$$\text{concentración de ARN} = \frac{\text{valor de absorbancia} \times 40 \times \text{dilución (400)}}{1000}$$

5.2. Material biológico

5.2.1. Ovocitos de *Xenopus laevis* como modelo para el estudio de receptores

Los ovocitos de *Xenopus laevis* son un modelo experimental para la expresión heteróloga de receptores de membrana y que en la actualidad es muy utilizada por numerosos laboratorios de investigación. Para ello, los ovocitos son inyectados con ARN o cDNA que codifica para la proteína de interés que será expresada utilizando la maquinaria interna de los mismos. De esta manera, se pueden estudiar las propiedades de las corrientes inducidas a través del canal del receptor por los agonistas, con un alto nivel de sensibilidad y selectividad.

Una vez que los receptores se expresan en la membrana del ovocito, se estudian las corrientes eléctricas, mediante una técnica que se fundamenta en la fijación de voltaje.

5.2.2. Preparación de los ovocitos de *Xenopus laevis* para microinyección

El ovario de rana tiene de 24 a 28 lóbulos o sacos con folículos de ovocitos en varios estadios de desarrollo, éstos miden aproximadamente 1.5 mm de diámetro. Los ovocitos son obtenidos de ranas maduras de la especie *Xenopus laevis*, adquiridas en Nasco (Fort Atkinson, WI. USA) estas fueron mantenidas en condiciones de bioterio (Figura 13). Previo a la disección la rana fue anestesiada colocándola en una caja con agua y hielo (en proporción 1:1) Después de 30 min los animales fueron sometidos a cirugía. Para lo cual se colocaron en posición decúbito dorsal. Se realizó un corte en la piel de aproximadamente 1 cm en diagonal a la línea media de la región abdominal. Se disecaron los planos musculares hasta visualizar el ovario, el cual se incidió para extraer los lóbulos ováricos, los cuales desde este momento fueron mantenidos a 17°C en una caja de Petri con solución de Barth con gentamicina.



Figura. 13. Rana *Xenopus laevis* adulta. Anfibio casi exclusivamente acuático que habita naturalmente en el sur de África. Pertenece al Orden *Anura* y al Suborden *Pipoidea* (rana con uñas). Existen grandes poblaciones en California, Chile, Gran Bretaña y probablemente otras regiones del mundo.

Una vez que fueron extraídos los lóbulos ováricos rodeados de tejido conectivo, se suturaron las capas musculares y posteriormente la piel. Finalmente la rana se mantuvo en un recipiente con agua limpia, y se trasladó al bioterio en donde se mantuvo aislada hasta su recuperación, una vez recuperada se reintegró a la colonia.

Los ovocitos fueron separados manualmente hasta tener células individuales. Posteriormente se seleccionaron aquellos ovocitos que no presentaron daño externo aparente, en estados V y VI de acuerdo a la clasificación de Dumont, los cuales se caracterizan por ser los de mayor tamaño y por presentar una definición clara y homogénea de los hemisferios animal (color pardo oscuro) y vegetal (color amarillo claro) (Soreq y Seidman, 1999) (Figura.14)



Figura. 14. Disección de rana, lóbulos y ovocitos. En (A) se muestra a la rana durante la cirugía en el momento donde los lóbulos son extraídos con una pinza de disección. Posteriormente los lóbulos (B) son separados en células individuales (C), ovocitos en estadio V y VI sin daño aparente.

5.2.3. Microinyección.

Al día siguiente los ovocitos fueron inyectados con 50 nL de la mezcla de cada uno de los ARN que codifican para las distintas subunidades del receptor nicotínico, a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con un nanoinyector (Nanoliter 2000, World Precision Instruments, Inc. Modelo B203XVY).

Las micropipetas de inyección se prepararon con un estirador de pipetas (Sutter P-30) con capilares de vidrio (Drumond Scientific). Después de la inyección los ovocitos se mantuvieron en frascos con solución de Barth con gentamicina (renovando la solución diariamente) a una temperatura de 17°C.

Dos días después de la nanoinyección, la capa folicular que envuelve a los ovocitos fue removida mediante un tratamiento enzimático con colagenasa tipo 1A en solución de Ringer, para remover la colagenasa los ovocitos fueron lavados varias veces con solución de Barth y se mantuvieron incubados dos días más en solución de Barth a 17°C hasta que fueron utilizados en los ensayos electrofisiológicos.

Nota: La solución de Barth en la que se mantiene a los ovocitos fue continuamente renovada y los ovocitos que han muerto fueron eliminados para evitar daño a los ovocitos viables.

5.3. Registros electrofisiológicos

Las corrientes de membrana se registraron mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos después de 4-9 días de la inyección de los ARNm, tiempo en el cual se llevó a cabo la traducción de los transcritos y la incorporación de los receptores a la membrana del ovocito.

Una vez que en el ovocito se expresaron los receptores nicotínicos neuronales en su membrana, fue colocado en una cámara de registro, la cual estuvo perfundida continuamente con solución Ringer. La aplicación de las distintas soluciones se realizó mediante un sistema de perfusión a una velocidad de 10 mL/min. El líquido fue removido de la cámara a través de una pipeta conectada a un sistema de vacío.

Todas las soluciones se prepararon con Ringer, y los receptores fueron activados con acetilcolina. Las respuestas fueron registradas con ayuda de un amplificador comercial (Warner OC-725A; Warner Instruments Corp, Hamden, CT, USA) y detectadas con un osciloscopio (Nicolet 310; Nicolet instruments Corp, Madison, WI, USA). El voltaje de membrana del ovocito fue fijado a -60 mV. Los registros se almacenaron para análisis posterior con los programas Nicolet y Origin.

La curva de inhibición de la amplitud de ACh por erisopina fue obtenida mediante la ecuación de Hill:

$$I_{erisopina} = \frac{I_p \times IC_{50}^{n_H}}{(erisopina^{n_H} + IC_{50}^{n_H})}$$

Donde: $I_{erisopina}$ = es la corriente inhibida por erisopina

I_p = corriente máxima control

IC_{50} = concentración de erisopina que inhibe el 50% de la corriente

$n_H = 1.2$

(Tomado de García-Colunga y Milledì, 1999)

6. RESULTADOS

Una vez obtenida la expresión de los receptores nicotínicos neuronales (subtipos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ y musculares ($\alpha 1\beta 1\gamma\delta$) en ovocitos de *Xenopus laevis*, se estudiaron las corrientes inducidas por acetilcolina y su modulación por el alcaloide erisopina obtenido de semillas de *Erythrina americana* (proporcionado por la Dra. María Eugenia Garín Aguilar. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM) a distintas concentraciones. Para ello se empleó la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos, manteniendo el voltaje de la membrana del ovocito a -60 mV.

Se incluyeron siempre como controles a los ovocitos no inyectados, mismos que no presentaron ninguna respuesta a la aplicación de una concentración alta de acetilcolina (100 μ M).

Para la mayoría de los experimentos se empleó acetilcolina 500 nM, concentración a la cual la desensibilización de los receptores nicotínicos es muy baja, con lo que se puede evaluar de manera clara el efecto de los inhibidores de la corriente.

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante la realización del proyecto.

6.1. Corriente control activada por acetilcolina

En esta serie de experimentos se registraron las corrientes iónicas activadas por acetilcolina, que de acuerdo con la técnica de fijación de voltaje, para que la membrana del ovocito sea mantenida a un voltaje establecido (-60

mV), se requiere de la inyección de corriente por uno de los electrodos; esta corriente se denomina corriente de mantenimiento y se observa como una línea continua en el plano horizontal hasta antes de la aplicación del agonista (Figura 15). Una vez que la acetilcolina (ACh) es perfundida e interactúa con los receptores nicotínicos, éstos se activan permitiendo el paso de iones a través del canal (corriente eléctrica). Esta corriente se observa como un desplazamiento hacia abajo, y es denominada por convención como una corriente entrante. Esta respuesta alcanza su valor máximo y después va disminuyendo lentamente dependiendo de la concentración empleada de acetilcolina, producto de la desensibilización de los receptores nicotínicos.

Las concentraciones de acetilcolina probadas para el subtipo $\alpha 4\beta 4$ fueron 500 nM y 2 μ M. El efecto de la concentración de acetilcolina sobre la desensibilización de los receptores nicotínicos es evidente, ya que a bajas concentraciones (500 nM) la desensibilización es mínima, es decir, en presencia del agonista la corriente se mantiene casi constante durante el curso de la aplicación de la ACh (Figura 15, trazo en color negro); en contraste, al aumentar la concentración de ACh (2 μ M) la desensibilización es mayor, lo cual se observa en el decaimiento de la corriente (Figura 15, trazo en color rojo).

La concentración de acetilcolina aplicada a lo largo de este proyecto fue de 500 nM.

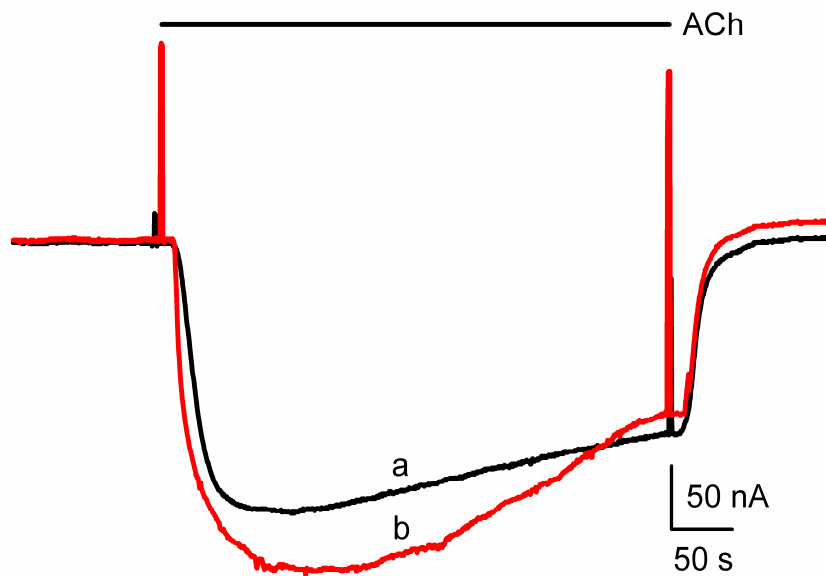


Figura. 15. Efecto de erisopina en corrientes activadas por acetilcolina en el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 4$. Registro electrofisiológico continuo de receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ de rata en el cual se observa corrientes entrantes. La corriente al aplicar 2 μM de ACh es mayor (trazo rojo,b) en comparación con la corriente generada con 500 nM de ACh (trazo negro, a). El potencial de mantenimiento fue de -60 mV en todos los experimentos. El inicio y término de aplicación de ACh se marca con un pulso de despolarización de 20 mV con el que se detecta el cambio en la conductancia de la membrana del ovocito.

6.2. Efecto inhibitorio de erisopina en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$.

Se evaluó el efecto que tiene el alcaloide erisopina sobre la corriente inducida por acetilcolina en ovocitos que expresaron los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$. Primero, se obtuvo la corriente iónica control durante siete minutos de perfusión continua con acetilcolina 500 nM (Figura 16). Después, se perfundió al ovocito por 20 min con Ringer normal, para remover la acetilcolina de los receptores nicotínicos. Posteriormente se activaron a estos receptores nicotínicos con la misma concentración de acetilcolina, y después de dos minutos se adicionó erisopina 20 nM. En este ejemplo, la magnitud de la corriente control inducida por acetilcolina a los cinco minutos fue de 93 nA, la cual se redujo a 3 nA después de aplicar erisopina 20 nM por tres minutos. Para evaluar el efecto de erisopina, como el porcentaje de la corriente resistente a esta sustancia, se tomaron los valores de ambas corrientes a los cinco minutos después de activar con acetilcolina. Así, se dividió el valor de la corriente en presencia de acetilcolina y erisopina entre el valor de la corriente control activada sólo con acetilcolina, el valor obtenido fue multiplicado por 100. El porcentaje de inhibición de la corriente fue del 99 %, n=11.

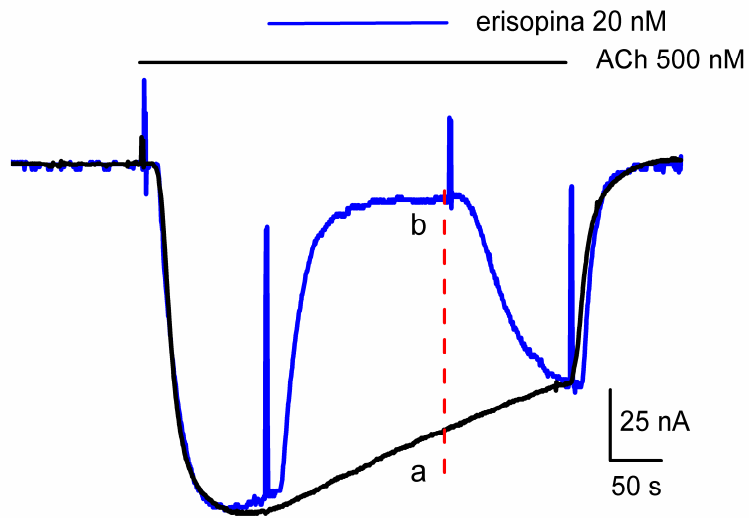


Figura. 16. Efecto inhibitorio de erisopina en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$. Los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ expresados en ovocitos de *Xenopus laevis* fueron activados con 500 nM de ACh (registro de color negro). Bloqueo de la corriente por 20 nM de erisopina (registro de color azul). La línea horizontal continua negra indica el tiempo de aplicación de la acetilcolina, mientras que la línea azul indica el tiempo de aplicación de erisopina. La línea punteada a-b indica la disminución de la corriente, efecto de erisopina 20 nM (n = 11).

6.3. Relación concentración de erisopina vs efecto

Una vez que se observó que el alcaloide erisopina tiene un efecto inhibitorio sobre los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$, se procedió a probar distintas concentraciones del alcaloide, con el objeto de encontrar la concentración de erisopina que inhibe el 50% de la respuesta máxima (IC_{50}). Para ello se registraron las corrientes utilizando un protocolo de perfusión continua de 500 nM de acetilcolina durante 7 minutos, a los 2 minutos se aplicaron las distintas concentraciones de erisopina; las cuales van desde aquellas que no tienen efecto hasta aquellas que inhiben totalmente la corriente (0.2 nM a 20 nM).

Los resultados mostraron que conforme va aumentando la concentración de erisopina, su efecto inhibitorio sobre la corriente control (inducida por 500 nM de acetilcolina) es mayor. Este efecto se muestra como la razón o cociente de la corriente en presencia de erisopina en relación a la corriente control (I_e/I_c), ambas medidas se obtienen a los cinco minutos después de iniciada la aplicación de acetilcolina. Cuando el valor de esta razón es igual a la unidad, es indicativo de que no hubo ningún efecto sobre la corriente control. Si el valor es menor a la unidad el efecto es inhibitorio. En la Figura 17 se observa la curva dosis-respuesta a partir de la cual se obtuvo la IC_{50} y se presentan tres registros corresponden a algunas de las concentraciones estudiadas. En el primer trazo (Figura 17, B) se muestra el efecto inhibitorio de erisopina 2 nM, En el segundo se observa el efecto inhibitorio de erisopina 5 nM y finalmente con erisopina 20 nM donde el bloqueo de la corriente es cercano al 100%.

Los resultados mostraron que conforme fue aumentando la concentración de erisopina, la corriente inducida por acetilcolina fue menor (Figura 17, B). Con 2 nM de erisopina, el porcentaje de la corriente remanente inducida por acetilcolina fue de $87.4 \pm 2.6\%$, con 5 nM de $65.9 \pm 2.6 \%$, y con 20 nM fue de $23.9 \pm 5.4 \%$. Ajustando los datos con la ecuación de Hill, se obtuvo la IC_{50} de erisopina para los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$, que fue de 9.3 ± 0.7 nM, y el coeficiente de Hill (nH) de 1.2 ± 0.1 .

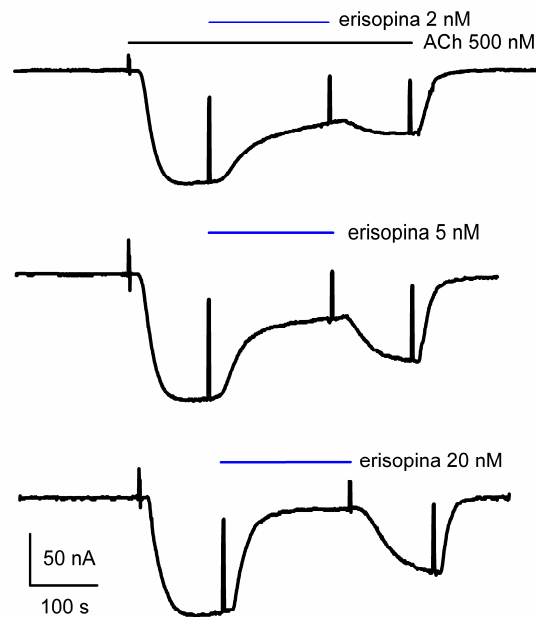
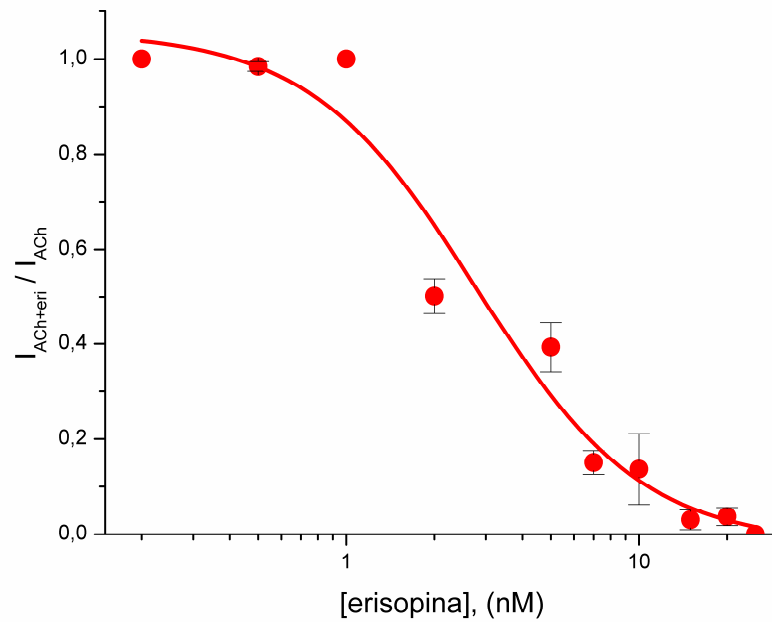


Figura. 17. Bloqueo de la respuesta de acetilcolina por erisopina en función de su concentración. A) Relación dosis-respuesta de erisopina en corrientes activadas con 500 nM de ACh. La IC_{50} es de 9.3 nM B) Registros del efecto inhibitorio de algunas concentraciones de erisopina sobre la corriente inducida por ACh.

6.4. Erisopina como antagonista competitivo

En este proyecto se evaluó si este alcaloide compite o no con la acetilcolina, por el mismo sitio de unión en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$. Para ello se realizaron las curvas dosis-respuesta a concentraciones de 500 nM y 2 μ M de acetilcolina

Los resultados mostraron que la amplitud de la corriente va aumentando en función de la concentración de acetilcolina, así como la rapidez de desensibilización. En la Figura 18 A, se observa que la curva dosis-respuesta obtenida con 2 μ M de acetilcolina está desplazada hacia la derecha de la curva obtenida con 500 nM de acetilcolina. Haciendo evidente que a la misma concentración de erisopina el porcentaje de bloqueo es menor cuando se activa con 2 μ M que al aplicar acetilcolina 500 nM. Lo cual sugiere que erisopina es un antagonista competitivo. En la Figura 13 B, se ilustran dos registros que pertenecen a las concentraciones de 500 nM y 2 μ M de acetilcolina evaluadas, en ambos registros se aplicó erisopina 20 nM, donde se evidencia que el bloqueo de erisopina 20 nM es mayor cuando se emplea una concentración de 500nM de ACh, este efecto inhibitorio de erisopina 20 nM se ve disminuido cuando se emplea una concentración más alta de ACh 2 μ M, lo cual indica que erisopina compite por el mismo sitio de unión de ACh.

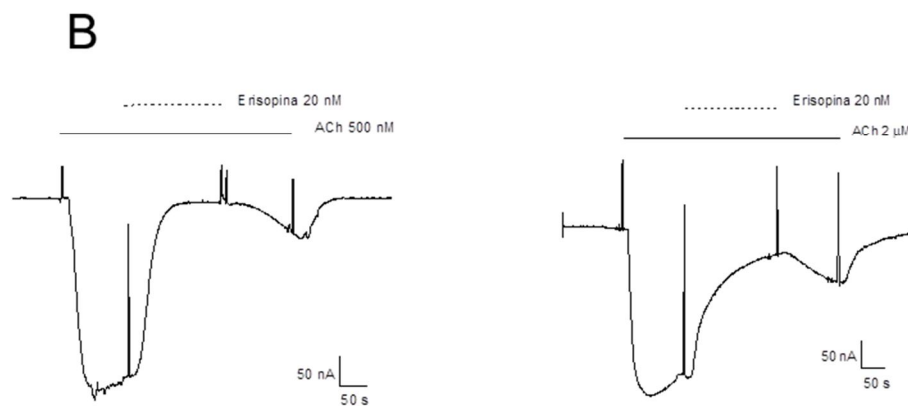
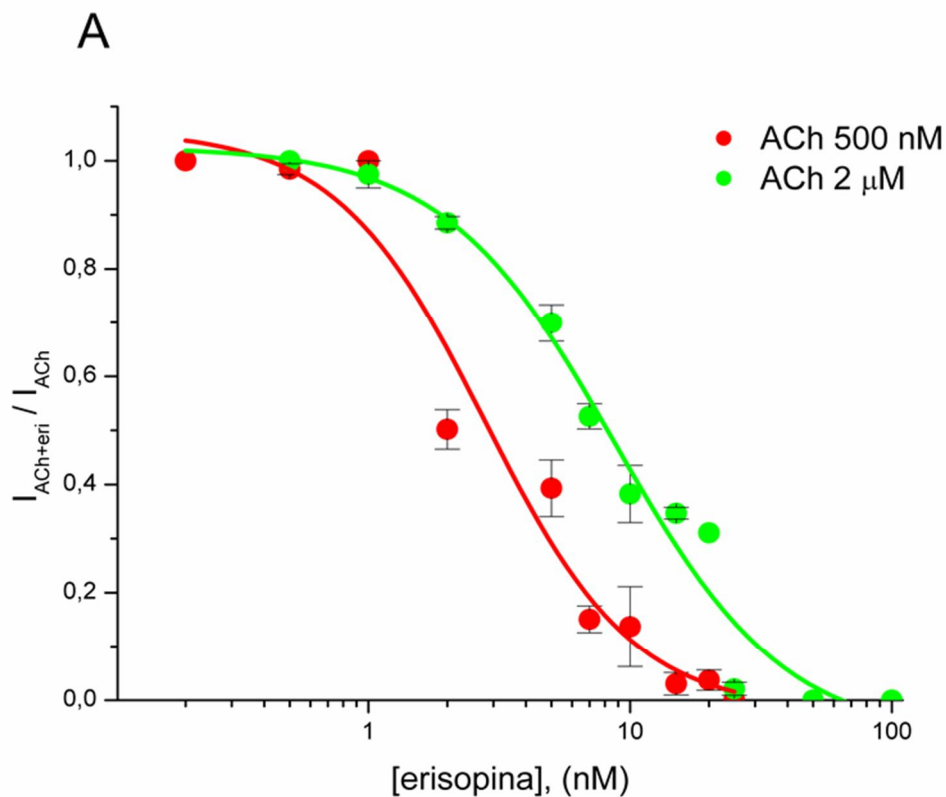


Figura 18. Erisopina como antagonista competitivo de los receptores nicotínicos neuronales. A) Curva dosis - respuesta. Se observa que la curva correspondiente a los experimentos donde se empleó 2 μ M de ACh se encuentra desplazada hacia la derecha, indicando que al aumentar la concentración de ACh el porcentaje de bloqueo por erisopina se ve disminuido. B) Efecto inhibitorio de la corriente iónica inducida con 500 nM y 2 μ M de ACh. El efecto inhibitorio varía de magnitud dependiendo de la concentración de agonista utilizada. Esto indica que erisopina es un antagonista competitivo de receptores nicotínicos α 4 β 4.

6.5. Efecto de erisopina en comparación con otros antagonistas

Con la finalidad de obtener información comparativa, en este proyecto se evaluó el efecto de erisopina 20 nM en comparación con otros antagonistas competitivos selectivos de receptores nicotínicos neuronales del subtipo $\alpha 4\beta 4$, los antagonistas empleados fueron: dihidro-beta-Eritroidina (DH β E, RBI-Sigma) y erisodina (proporcionado por la Dra. María Eugenia Garín Aguilar. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM), ambos a una concentración de 20 nM. En la Figura 19 se muestran los registros obtenidos con 20 nM, de los tres antagonistas, estos se presentan en orden decreciente de bloqueo. La corriente inducida con 500 nM de ACh se inhibe $76.1 \pm 3\%$ con 20 nM erisopina, $46.0 \pm 1.1\%$ con 20 nM de erisodina y $17.6 \pm 3.3\%$, con 20 nM de DH β E. Esta diferencia en la inhibición se observa más claramente en la Figura 20 donde se hace evidente que la erisopina bloquea 1.6 veces más que la erisodina y 4 veces más que la DH β E. Esto sugiere que la erisopina, a una concentración de 20 nM tiene mayor efecto de bloqueo que erisopina y DH β E en los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$.

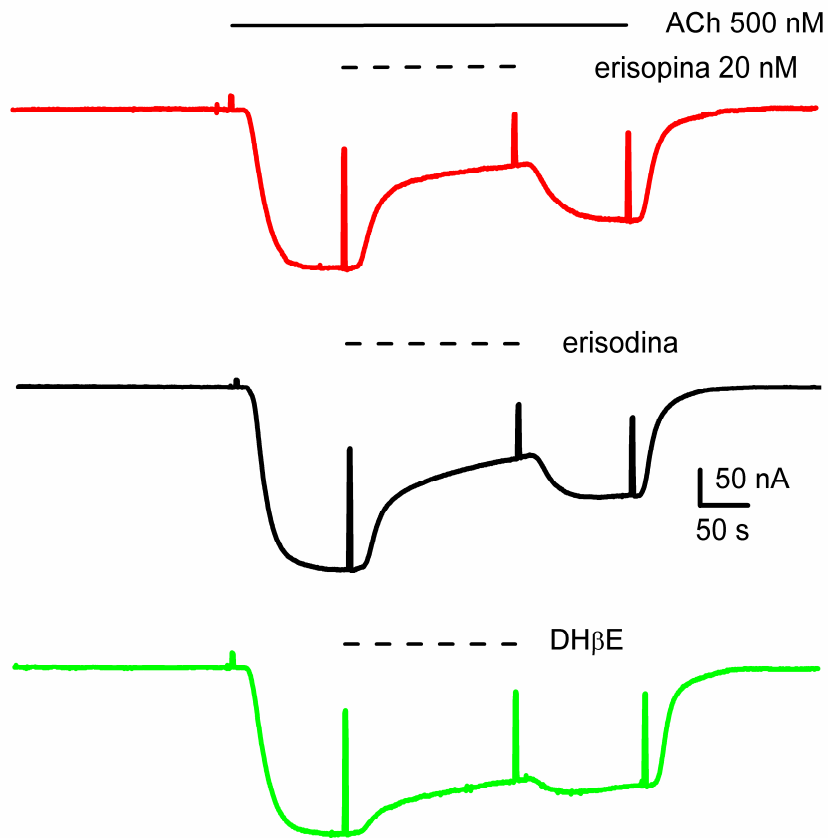


Figura 19. Erisopina en comparación con antagonistas competitivos.

Registros de tres antagonistas de receptores nicotínicos neuronales. El porcentaje de bloqueo de la corriente activada con 500 nM de acetilcolina se muestra para cada antagonista. El mayor porcentaje de bloqueo se observa en el registro con erisopina (76.1%, trazo en rojo) y el menor bloqueo se observa para la DHβE (17.58%, trazo en verde). Lo cual indica que la erisopina a esta concentración (20 nM) tiene un efecto mayor que erisodina y DHβE en receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$.

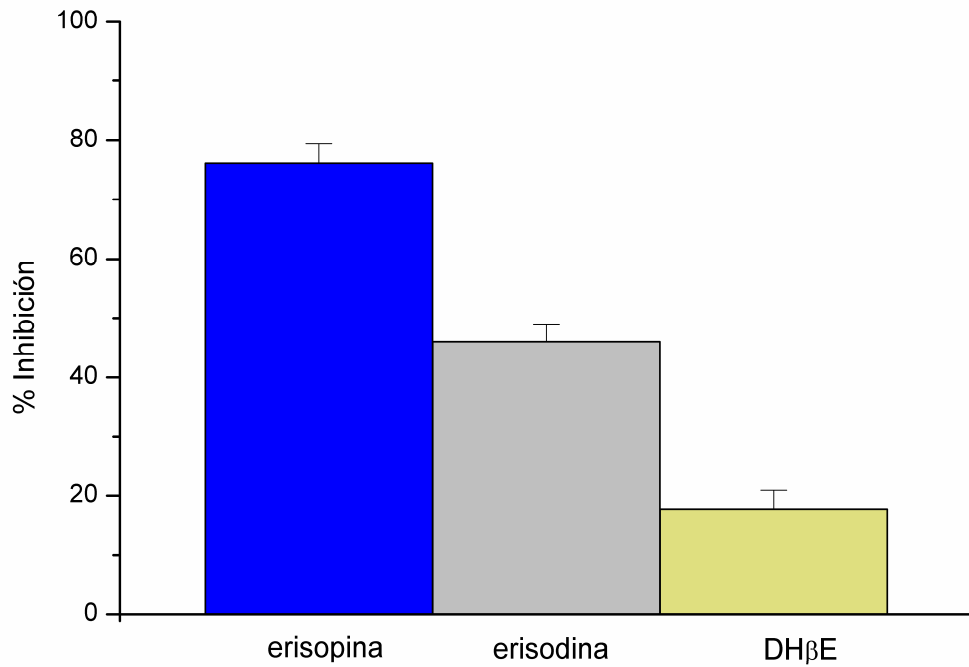


Figura 19. Antagonistas de receptores nicotínicos neuronales. La inhibición de la corriente generada por 500 nM de ACh fue $76.1 \pm 3\%$ con 20 nM de erisopina, $46.03 \pm 1.1\%$ con 20 nM de erisodina y $17.58 \pm 3.3\%$ con 20 nM de DHβE. De estos tres antagonistas erisopina inhibe más.

Una vez caracterizado el efecto del alcaloide erisopina sobre el subtipo de receptor nicotínico $\alpha 4\beta 4$, se procedió a evaluar el efecto de este alcaloide sobre otros subtipos de receptores, para evaluar si es un antagonista selectivo.

6.6. Relación dosis-respuesta de erisopina en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$

Para el caso de este subtipo de receptor $\alpha 4\beta 2$, se observa que la erisopina inhibe las corrientes inducidas con acetilcolina. Se probaron dos concentraciones de acetilcolina, una pequeña de 500 nM y otra de 50 μ M. Los registros muestran que la inhibición de erisopina disminuye al aumentar la concentración de acetilcolina; lo que indica que está compitiendo por el mismo sitio de unión a acetilcolina, así podemos sugerir que erisopina es un antagonista competitivo de receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ (Figura 19).

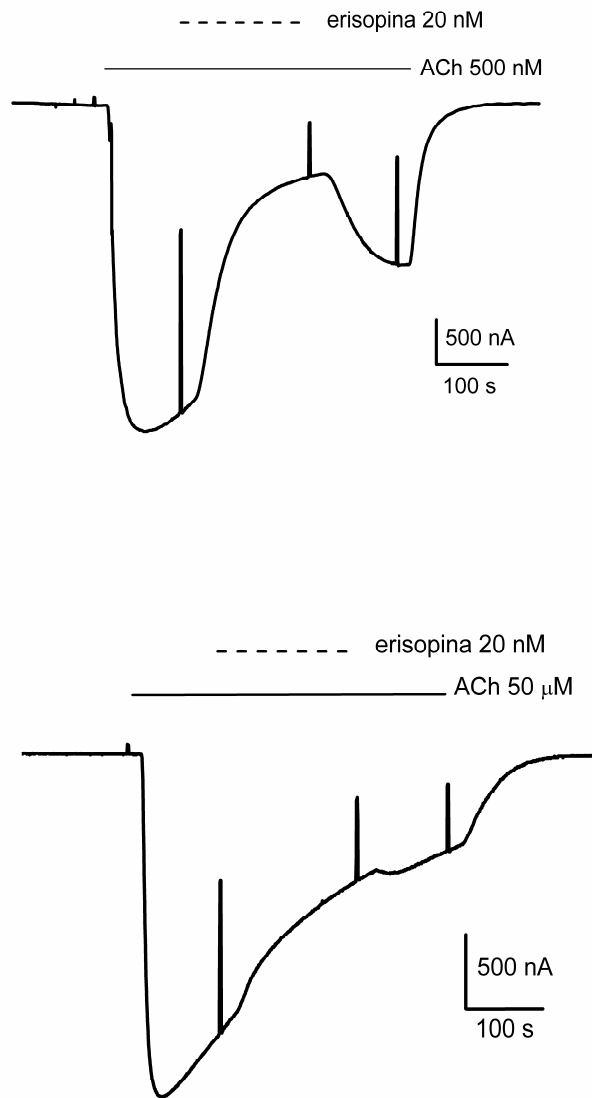


Figura 20. Antagonista competitivo de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$. Efecto inhibitorio de 20 nM de ACh sobre la corriente iónica inducida con 500 nM y 50 μ M de ACh. Los efectos inhibitorios varían dependiendo de la concentración utilizada de agonista. A medida que se incrementa la concentración de ACh la inhibición por erisopina disminuye. Esto indica que erisopina es un antagonista competitivo de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$.

6.7. Erisopina en receptores nicotínicos musculares $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$

Posteriormente se procedió a evaluar el efecto del alcaloide erisopina en receptores nicotínicos musculares de rata, para determinar si es un antagonista selectivo de receptores nicotínicos neuronales. En la Figura 20 se muestran dos registros obtenidos en ovocitos que expresaban receptores nicotínicos musculares, cuya corriente fue activada con 500 nM de acetilcolina. Es evidente que erisopina 20 nM tuvo muy poco efecto sobre la corriente, inhibiendo sólo el $3.8 \pm 0.04\%$. Lo que indica que erisopina es un antagonista selectivo de receptores nicotínicos neuronales.

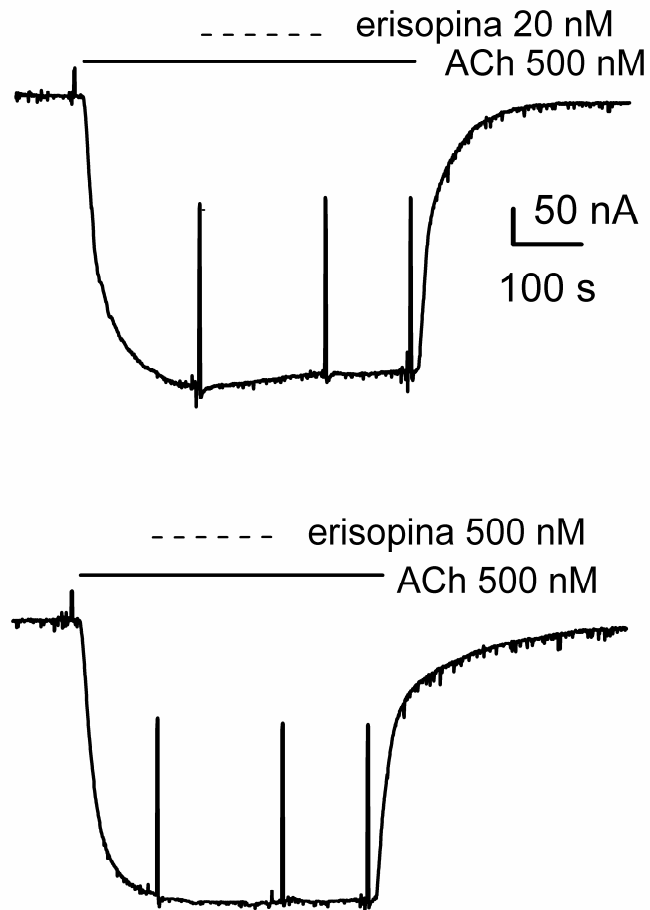


Figura 20. Efecto de erisopina en receptores nicotínicos musculares $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$. La inhibición de receptores nicotínicos musculares por erisopina 20 nM fue $3.8 \pm 0.04\%$ de la respuesta inducida con 500 nM de acetilcolina.

6.8. Erisopina potente antagonista de receptores $\alpha 4\beta 2$

Después de que se evaluaron algunas características de los efectos inhibitorios que tiene la erisopina sobre los receptores neuronales $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 4\beta 4$ se hizo una comparación con la finalidad de mostrar la afinidad de la erisopina por estos receptores.

Los resultados mostraron que erisopina es un antagonista más potente para inhibir a los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ que a los receptores $\alpha 4\beta 4$. En la Figura 21, se observa que la curva dosis-respuesta para los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ (trazo negro) está desplazada a la izquierda de el trazo en azul que corresponde a los receptores $\alpha 4\beta 4$. Haciendo evidente que a la misma concentración de erisopina el porcentaje de bloqueo es mayor en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ que en los receptores $\alpha 4\beta 4$. Erisopina es más potente para inhibir a los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ ($IC_{50} = 2.74 \pm 0.80$ nM, $nH = 1.5 \pm 0.05$) que a los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ ($IC_{50} = 9.81 \pm 0.66$ nM, $nH = 1.2 \pm 0.08$)

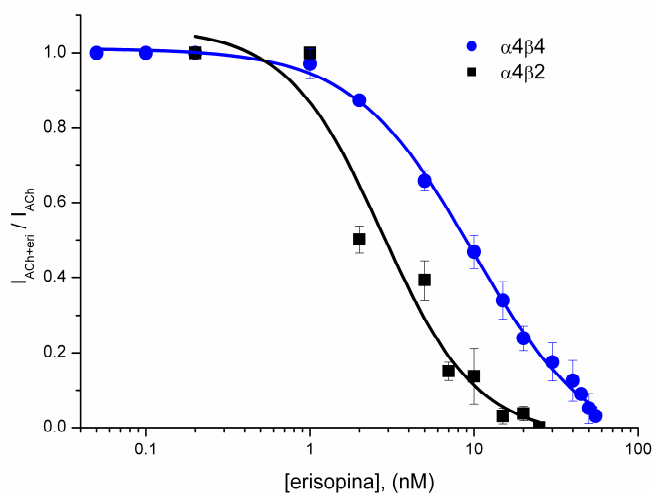


Figura 21. Erisopina potente antagonista de receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$. Curva dosis-respuesta. Se observa que la curva en negro que corresponde a los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ está desplazada a la izquierda de la curva en azul que corresponde a los receptores $\alpha 4\beta 4$, indicando que a la misma concentración de erisopina el porcentaje de bloqueo es mayor en los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ que en los receptores $\alpha 4\beta 4$. Erisopina es más potente para inhibir a los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ ($IC_{50} = 2.74 \pm 0.80$ nM, $nH = 1.5 \pm 0.05$) que a los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ ($IC_{50} = 9.81 \pm 0.66$ nM, $nH = 1.2 \pm 0.08$).

6.9. RESUMEN DE RESULTADOS

1. Erisopina inhibe las corrientes inducidas por acetilcolina en los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ dependiendo de su concentración, con una IC_{50} de 9.3 nM.
2. Erisopina inhibe las corrientes inducidas por acetilcolina en receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ dependiendo de su concentración con una IC_{50} de 2.74 nM.
3. Erisopina es un potente antagonista de receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$.
4. Erisopina actúa como antagonista competitivo en los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$ activados con acetilcolina.
5. Erisopina es más potente que Dihidro β eritroidina y erisodina para inhibir a los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$
6. Erisopina no inhibe receptores nicotínicos musculares $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$

7. DISCUSIÓN

El objetivo principal de este estudio fue determinar los efectos del alcaloide erisopina en los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$.

La erisopina tiene una similitud estructural a la dihidro-beta-eritroidina (DH β E), un derivado sintético del alcaloide β -eritroidina presente en el mismo género (*Erythrina*), el cual es un alcaloide antagonista no competitivo de los receptores nicotínicos neuronales heteroméricos. La DH β E bloquea la respuesta del agonista en receptores de rata $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 4\beta 4$, con un valor de IC₅₀ de 370 y 190 nM, respectivamente (Harvey y Luetje, 1996). En receptores expresados en células PC12 y TE671, DH β E es aproximadamente 10 veces más selectivo para receptores nicotínicos humanos $\alpha 4\beta 4$ que para $\alpha 4\beta 2$, con una IC₅₀ de 10 y 110 nM, respectivamente (Chávez Noriega *et al.*, 1997). En el presente estudio erisopina inhibió las corrientes activadas con acetilcolina en el receptor nicotínico $\alpha 4\beta 4$, dependiendo de la concentración de erisopina. El valor calculado de la IC₅₀ en este estudio es 9.3 nM, mientras que la IC₅₀ de DH β E para este mismo receptor es de $0.19 \pm 0.01 \mu\text{M}$ (Papke *et al.*, 2008), por lo cual erisopina es un inhibidor más potente de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ que la DH β E.

Para el caso de los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ de rata se encontró que erisopina es un potente inhibidor, cuya IC₅₀ es de 2.7 nM incluso la inhibición es mayor que en los receptores $\alpha 4\beta 4$.

En comparación con su homólogo $\alpha 4\beta 2$ de humano donde la erisopina presenta una IC_{50} de 201 nM (Iturriaga-Vásquez *et al.*, 2010), erisopina es más potente para inhibir los receptores nicotínicos neuronales de rata $\alpha 4\beta 2$ cuyo IC_{50} es del orden de 2.7 nM, aunque esto podría variar dependiendo de la concentración empleada de acetilcolina con la que se activa el receptor nicotínico.,

Esto evidencia que pese a que las subunidades de receptores nicotínicos neuronales humanos $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 4\beta 4$ muestran del 91-99% de aminoácidos idénticos con su homólogo de rata (Anand y Lindstrom, 1990), las pequeñas diferencias que existen en las secuencias de aminoácidos pueden afectar las propiedades de los receptores nicotínicos.

Por otro lado, erisopina es un antagonista competitivo de receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$, debido a que a la misma concentración de erisopina, el porcentaje de bloqueo varía dependiendo de la concentración de acetilcolina empleada. Cuando se activa con 2 μ M el bloqueo es menor que al emplear acetilcolina 500 nM, lo cual sugiere que es un antagonista competitivo; lo mismo ocurre en receptores nicotínicos neuronales de humano del subtipo $\alpha 4\beta 2$ (Iturriaga-Vásquez *et al.*, 2010). De esta manera sabemos que el alcaloide erisopina está interactuado en el mismo sitio de unión de la acetilcolina.

Se sabe que varios residuos de aminoácidos que están altamente conservados contribuyen al sitio de unión de la acetilcolina, estos se encuentran en seis secuencias no contiguas, llamadas asas A, B y C (el principal componente está dentro de la subunidad $\alpha 4$), y D, E y F (este componente complementario se

localiza dentro de la subunidad β). En los receptores $\alpha_4\beta_2$ esos residuos son los siguientes:

α_4 Tyr126, α_4 Trp182, α_4 Tyr223, α_4 Tyr230 y β_2 Trp82.

Es decir, el dominio extracelular de las subunidades α y β de los receptores nicotínicos, contribuyen a la sensibilidad para DH β E (Harvey y Luetje, 1996).

Por otro lado, erisopina al igual que DH β E y otros alcaloides del género *Erythrina* poseen un nitrógeno terciario en el catecol, este nitrógeno es un punto importante de interacción con el sitio de unión al receptor nicotínico (Crestey *et al.*, 2013).

La inhibición podría estar parcialmente gobernada por interacciones entre erisopina y los residuos aromáticos conservados en el sitio de unión a agonistas de los receptores nicotínicos. Al parecer el grupo lactona de erisopina encaja en la canasta que forman los residuos Tyr126, Tyr223, Tyr230 y Trp182 presentes en la subunidad α y Trp82 de la subunidad β , siendo el grupo hidroxil ubicado en el carbono 16 de la erisopina el que establece un puente de hidrógeno con el residuo α_4 Tyr126, y al parecer es esta interacción la que contribuye a la sensibilidad de la inhibición del receptor nicotínico por la erisopina (Iturriaga-Vásquez *et al.*, 2010).

Para los agonistas, la principal interacción es con Trp182 de la subunidad α , mientras que la principal interacción de erisopina podría ser con el Asp196, esto debido a que el nitrógeno de erisopina tiene un gran impedimento estérico debido a estructura tricíclica que lo rodea (Iturriaga-Vásquez *et al.*, 2010), así es que, erisopina actúa directamente en el mismo sitio de unión a ACh, aunque con

algunas pequeñas diferencias determinadas por el impedimento estérico del nitrógeno presente en la estructura de erisopina. Actuando erisopina como un antagonista competitivo selectivo de receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$.

Finalmente se realizó una comparación sobre los receptores neuronales $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 4\beta 4$ y musculares $\alpha 1\beta 1\gamma\delta$, donde se observó que erisopina es un antagonista muy afín para los receptores nicotínicos neuronales, siendo más potente para inhibir a los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ con una IC_{50} de 2.74 nM que a los $\alpha 4\beta 4$ cuya IC_{50} es de 9.3 nM y es muy poco afín a los receptores nicotínicos musculares. Debido a la afinidad que presenta erisopina por los receptores nicotínicos neuronales podría ser útil en el tratamiento o control de algunos trastornos.

Por otro lado, sabemos que los receptores nicotínicos de acetilcolina se definieron inicialmente como muscarínico o nicotínico, basados en la activación selectiva por dos productos naturales, nicotina y muscarina, a partir de ahí otros agonistas nicotínicos han sido descubiertos a partir de fuentes naturales, incluyendo la citisina, anatoxina, anabaseina, epibatidina y epiquinamida.

Fuentes naturales también han proporcionado antagonistas nicotínicos, como tubocurarina, metillicaconitina y β -eritroidina. Estos productos naturales han proporcionado las estructuras base para el diseño de una amplia gama de agentes sintéticos.

Erisopina es un antagonista competitivo de receptores nicotínicos proveniente de una fuente natural, hay mucho por explorar, pues, tal vez exista

aun, otro compuesto en la naturaleza que pueda ser útil para la caracterización farmacológica o sirva para el tratamiento de patologías en las que están involucrados los receptores nicotínicos.

8. CONCLUSIONES

Analizando los resultados obtenidos en este proyecto podemos concluir que erisopina tiene un efecto inhibitorio sobre las corrientes iónicas inducidas por acetilcolina en los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 4$ y $\alpha 4\beta 2$ que fueron expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*. Este efecto es el resultado de la interacción de este alcaloide en el mismo sitio de unión para la acetilcolina, debido a que la inhibición es competitiva.

El alcaloide erisopina es un bloqueador más potente en receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$ que en receptores neuronales $\alpha 4\beta 4$.

Erisopina es muy poco afín a receptores musculares.

9. PERSPECTIVAS

Es importante continuar explorando el efecto de erisopina sobre otros subtipos de receptores nicotínicos, para determinar si este alcaloide es subtipo-selectivo.

Los posibles usos clínicos de las sustancias que interactúan con los receptores nicotínicos son de gran interés, debido a que estos podrían ser utilizados en el tratamiento o manejo de algunas patologías tales como Alzheimer, Parkinson, ansiedad y depresión, entre otros.

Así pues, es importante continuar con la caracterización de los receptores nicotínicos, para entender de qué manera participan en una determinada función fisiológica o patológica, para así poder diseñar fármacos selectivos que interactúen con un solo subtipo de receptor.

Para finalizar es importante continuar explorando las fuentes naturales (muchas de ellas empleadas en medicina tradicional) pues tal vez hay algún compuesto que pueda ser útil para tratar algunas patologías donde están involucrados los receptores nicotínicos, o bien sirvan de base para el diseño de nuevos fármacos.

10. REFERENCIAS

- Aguilar, M.I., Giral, F and Espejo, O. (1981). Alkaloids from the flowers of *Erythrina americana*. *Phytochemistry* 20:2061-2062
- Albuquerque, E.X.1, Pereira, E.F., Alkondon, M., Rogers, S.W.(2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* . 89:73-120
- Allen, O.N., Allen, E.K. (1981) The Leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation. Madison, WI (USA). The University of Wisconsin Press 453
- Anand, R., and Lindstrom, J. (1990) Nucleotide sequence of the human nicotinic acetylcholine receptor $\beta\beta$ 2 subunit gene. *Nucleic Acids Res.* 18:4272.
- Arias, H.R. (1998) Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem. Biophys.* 1376: 173-220.
- Arias, H.R. (2000) Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem Int.* 36(7): 595-645.
- Auro de Ocampo, A., y Jiménez, M. (1993) La herbolaria medicinal en el tratamiento de las enfermedades de los peces en México. *Vet. Mex.* 24(4):291-295.
- Barkley, R.A. (1990) Attention-deficit hyperactivity disorder: a handbook for diagnosis and treatment. New York: Guilford Press.1-10.

- Barrantes, J.(1996) Canales activados por ligandos. En: Latorre, R., López, J., Bezanilla F, Lliná R (eds). *Biofísica y Fisiología Celular*. Universidad de Sevilla 337-351
- Bonilla, R.J.A (2013) Determinación de la toxicidad, Actividad Sedante y Ansiolítica del extracto acuoso de las flores de *Erythrina berteroana* (Pito) en ratones NIH. tesis de licenciatura. San Salvador Centroamerica.
- Burghaus, L., Schutz, U.,Kremple, U., Lindstrom,J., Schoder, H.(2003) Loss of nicotinic acetylcholine receptors subunits alpha4 and alpha 7 in the cerebral cortex of Parkinson patients. *Parkinsonism Relat. Disord* . 9, 243-246.
- Changeux J.P (1990). The TIPS nicotinic acetylcholine receptor: an allosteric protein prototype of ligand gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 11: 485-492.
- Changeux, J.P., Edelman, S.J. (1998) Allosteric receptors after 30 years. *Neuron*. 21:959-980
- Changeux, J.P., Edelman, S.J. (2001) Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Current Opinion in Neurobiology* . 11:369-377
- Changeux, J.P. (2010) Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nature Reviews Neuroscience* 11, 389-401
- Chávez-Noriega, L.E., Corona, J.H.,; Washburn, M.S., Urrutia, A., Elliot, K.J., Jhonson, E.C.(1997) Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors h α 2 β 2, h α 2 β 4, h α 3

- $\beta\beta$ 2, h α 3 $\beta\beta$ 4, h α 4 $\beta\beta$ 2, h α 4 $\beta\beta$ 4 and h α 7 expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol Exp Ther.* 280(1):346-56.
- Cheeta, S., Tucci, S., File, S.E. (2001) Antagonism of the anxiolytic effect of nicotina in the dorsal raphé nucleus by di-hydro- $\beta\beta$ -erythroidine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* . 70:491-496.
- Clarke, P. (1999) Functional anatomy of nicotinic acetylcholine receptors in mammalian brain. Neuronal nicotinic receptors. Arneric, S. P. y Brionni, J. D. (Eds). Wiles-Liss, New York, USA.127-139
- Corringer, P.J., Le Novere, N., Changeux, J.P. (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* . 40:431-458.
- Court, J., Martín-Ruiz, C., Piggott, M., Spurden, D., Griffiths, M., Perry, E.T. (2001) Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* . 49:175-84.
- Craig, L.E (1981) Curare like-effects. Manske, R. F. and Holmes, H. L. The Alkaloids; Chemistry and Physiology. New York. Academic Press 265-293.
- Craig, L.E. (1955) *Erythrina* alkaloids. The Alkaloids. Manske, R. H. F. and Holmes, H. L. Eds. Vol. V. London. Academic Press. 265-293.
- Crestey, F.,; Jensen, A.A.,; Morten, B., ; Jesper, T.A., Jacob, A.,; Balle, T.,; Jesper, K. (2013) Design, Synthesis, and Biological Evaluation of *Erythrina* Alkaloid Analogues as Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonists. *J. Med. Chem.* 56 (23), 9673–9682
- Dajas-Bailador, F. and Wonnacott, S. (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 317–324

- Decker, M., Anderson, D.J., Brioni, J.D., Donnelly-Roberts, D.L., Hee, K. C., O'Neill, A. B., Piattoni-Kaplan, M., Swanson, S. & Sullivan, J. P.(1995) Erysodine, a competitive antagonist at neural nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Pharmacology* . 280:79-89.
- Fabián, A. and Germishhuizen, (1997) G. Wild flowers of Northern South Africa. , Fernwood Press, Vlaeberg.160–200, 400–408.
- Fagerstrom, K.O., Pomerleau, O., Giordani, B.,Stelson, F. (1994) Nicotine may relieve symptoms of Parkinson's disease. *Psychopharmacology*. 116:117-119.
- Freedman, R., Hall, M., Adler, L.E., Leonard, S. (1995) Evidence in postmortem brain tissue for decreased numbers of hippocampal nicotinic receptors in schizophrenia. *Biol Psychiatry* . 38: 22-33.
- García, M. R., Garín-Agular. .M., Soto, H. M., Martínez, V. M. (2000) "Effect of β -erythroidine and dihidro- $\beta\beta$ -erythroidine from *Erythrina americana* on rats aggressive behaviour". *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 10(1):34-37.
- García, M., R., M. Soto H. M Martínez.(2000) Toxicidad de los extractos de las semillas de *Erythrina americana*. *Ciencia Ergo Sum* 7(2): 166-170.
- García, M., R., M. Soto, H., Vibrans, H. (2001). *Erythrina americana* Miller (Colorín; Fabacea) a versatile resource from Mexico: a review. *Economic Botany* 55(3) 391-400.

- García, M., R., Pérez P. R., Rodríguez, H. C., Soto, H. M. (2004) Toxicidad de alcaloides de *Erythrina americana* en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Rev. Fitotecnia Mexicana* 27(4):297-303.
- García, Mateos., R., Soto, H. M., Kelly. D. (1998) Alkaloids from six *Erythrina* species endemic to Mexico. *Biochemical Systematics and Ecology*. 26:545-551.
- García-Colunga. J., Milledí, R. (1999). Blockage of mouse muscle nicotinic receptors by serotonergic compounds. *Exp Physiol*. 84:847-864.
- García-Mateos. R., Soto-Hernández. M., Martínez-Vázquez. M., Villegas-Monter. A. (1999) Isolation of alkaloids of *Erythrina* from tissue culture. *Phytochemical Analysis* 10:1-12
- Garín-Aguilar, M.E., Ramírez, L.J.E., Soto, H., Valencia del Toro., G., and Martínez, V.MM. (2000) "Effect of crude extracts of *Erythrina americana* Mill. on aggressive behaviour in rats". *Journal of Ethnopharmacology* . 69:189-196.
- Gattu, M., Terry, A.V., Pauly, J.R., Buccafusco, J.L.(1997) Cognitive impairment in spontaneously hypertensive rats: role of central nicotinic receptors. Part II. *Brain Res*. 771: 104-10.
- Hargreaves, R., Johnson, D., Millington, D., Mondal, M., Beavers, W., Becker, L., Young, C. and Rinehart, K.L. (1974) Alkaloids of American species of *Erythrina*. *Lloydia*. 37(4):569–580.
- Harris, D. y, Silver, A.A. (1995) Tourette's syndrome and learning disorders. *Learning Disabil* . 6:1-10.

- Harvey, S.C. and Luetje, C.W. (1996) Determinants of competitive antagonist sensitivity on neuronal nicotinic receptor beta subunits. *Journal of Neuroscience* . 16:3798-3806.
- Heidmann ,T., Changeux, J.P. (1979). Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites. *Eur J Biochem.* 94: 281-96.
- Hogg, R.C., Raggenbass, M., Bertrand, D. (2003) Nicotinic acetylcholine receptors: From structure to brain function. 2003. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147:1–46.
- Ibarra, E.,, Tellez, M., M. Soto, H., Martínez, V., R. García, M., y R. San Miguel. (2009) Actividad antimicótica in vitro de erisovina. *Revista Fitotecnia Mexicana* . 32(4):327-330.
- Iturriaga-Vásquez P., Carbone, A. , García-Beltrán, O. , Livingstone, P.D. , Biggin, P.C. , Cassels, B.K. , Wonnacott, S., , Zapata-Torres G. , Bermudez. (2010) Molecular determinants for competitive inhibition of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 78 (3): 366-75.
- Jaramillo, F., Vicini, S., Schuetze, S. M.(1988) Embryonic acetylcholine receptors guarantee spontaneous contractions in rat developing muscle. *Nature* . 335(6185):66-8
- Lawrence, A.D., Sahakian, B.J.(1998) The cognitive psychopharmacology of Alzheimer's disease: focus on cholinergic systems. *Neurochem Res* 23: 787-94.

- Le Novère, N., Changeux, J.P. (1995), Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 40(2):155-72
- Le Novère, N., P.J. Corringer, P.J., J.P. Changeux, J.P. (1999) Improved secondary structure predictions for a nicotinic receptor subunit: incorporation of solvent accessibility and experimental data into a two-dimensional representation. *Biophys J.* 76(5): 2329-45
- Leonard, S., Gault, J., Moore, T., Hopkins, J., Robinson, M., Olincy, A.(1998), Further investigation of a chromosome 15 locus in schizophrenia: analysis of affected sibpairs from the NIMH Genetics Initiative. *Am J.Med Genet.* 81: 308-12.
- Levin, E.D., Rezvani, A.H. (2002) Nicotinic treatment for cognitive dysfunction. *Curr Drug Targets CNS. Neurol Disord.* 1: 423-431.
- Lindstrom, J. (2000) The structure of neuronal nicotinic receptors. *Neuronal nicotinic receptors.* 101-146.
- Lozoya, X. y M. Lozoya. (1982) Flora medicinal de México. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ed. Plantas indígenas. Instituto Mexicano del Seguro Social. México. 64-67.
- Luetje, C.W., Patrick, J. (1991) Both alpha- and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci.* 11, 837-845.
- Marks, M. J., Romm, E., Campbell, S. M. and Collins, A. C. (1989): Variation of nicotinic binding sites among inbred strains. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33: 679–689,

- Martín-Ruiz, C.M., Haroutunian, V.H., Long, P., Young, A.H., Davis, K.L., Perry, E.K., (2003) *et al.* Dementia rating and nicotinic receptor expression in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol. Psychiatry*. 54: 1222-33.
- Megirian, D., Leary, D. E. and Staler, I. H. (1955) The action of some derivatives of beta-erythroidine of peripheral neuro-effector systems. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*. 113:212-227.
- Mihailescu, S., Drucker-Colin, R. (2000) Nicotine, brain nicotinic receptors, and neuropsychiatric disorders. *Arch Med Res*. 31:131-144.
- Morens, D.M., Grandinetti, A., Reed, D., White, L.R., Ross, G.W. (1995) Cigarette smoking and protection from Parkinson's disease: false association or etiologic clue? *Neurology*. 45: 1041-51.
- Neill, D. A. (1988) Experimental studies on species relationships of *Erythrina* (Leguminosae: Papilionoideae). *Annals of the Missouri Botanical Gardens*. 75, 886-969.
- Neill, D. A. (1993) The genus *Erythrina*: taxonomy, distribution and ecological differentiation. En: Westly, S. B. and Powell, M. H. *Erythrina* in the old and new worlds. Hawaii, U. S. A. Eds. Nitrogen Fixing Tree Association NFTA.
- Octave, J.N. (1995) The amyloid peptide and its precursor in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 6: 287-316.
- Papke, R., Dwoskin, L., Crooks, P., Zheng, G., Zhang, Z., McIntosh, J., Stokes, C. (2008) Extending the analysis of nicotinic receptor antagonists with the study of $\alpha 6$ nicotinic receptor subunit chimeras. *Neuropharmacology*. 54: 1189-1200.

- Paterson, D., Nordberg, A. (2000) Neuronal Nicotinic receptors in the human brain. *Prog. Neurobiol.* 61:75-111.
- Phillips, H.A., Scheffer, I.E., Berkovic, S.F., Hollway, G.E., Sutherland, G.R., Mulley, J.C. (1995) Localization of a gene for autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy to chromosome 209 13.2. *Nat. Genet.* 10,117-118.
- Picciotto, M.R., Caldarone, B.J., King, S.L., Zachariou, V. (2000) Nicotinic receptors in the brain. Links between molecular biology and behavior. *Neuropsychopharmacology.* 22:451-465.
- Picciotto, MR., Caldarone, B.J., Brunzell., Zachariou, V., Stevens, T.R., King, King, S.L. (2001) Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacology & Therapeutics.* 92(2-3):89-108
- Pino, R., Prieto, G. S., Pérez, R. M.E., Molina, T. J. (2004) Género *Erythrina*: fuente de metabolitos secundarios con actividad biológica. *Acta Farm. Bonaerence* 23: 252-258.
- Poirier, M.F., Canceil, O., Bayle, F. Millet, B., Boudel, M.C., Moatti, C., Olie, J.P., Attar-Levy, D. (2002) Prevalence of smoking in psychiatric patients. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 26, 529-537.
- Prince, R.J., Sine, S.M. (1998) The ligand binding domains of the nicotinic acetylcholine receptor. The nicotinic acetylcholine receptor: current views and future trends. Barrantes, J.F. Ed. Springer-Verlag, Heidelberg/Berlin. 31-53
- Raggenbass, M., Bertrand, D. (2002) Nicotinic receptors in circuit excitability and epilepsy. *J. Neurobiol.* 53, 580-589.

- Reimann, E. (2007). Synthesis pathways to *Erythrina* alkaloids and *Erythrina* type compounds. *Fortschr Chem. Org. Naturst.* 88:1-62.
- San Miguel-Chávez. R., Soto-Hernández. M., Ramos-Valdivia. A., Kite, G. (2007). Alkaloid production in elicited cell suspension cultures of *Erythrina americana* Miller. *Phytochemistry Review* 6:167-173
- Sanberg, P.R., Silver, A.A., Shytle, R.D., Philipp, M.K., Cahill, D.W., Fogelson, H.M. (1997), *et al.* Nicotine for treatment of Tourette's syndrome. *Pharmacol Ther.* 74: 21-5.
- Sánchez, H. S., Soto Hernández, R. M. Kite, G., García-Mateos M. R. (2001). Identificación de alcaloides en las inflorescencias de *Erythrina americana* Miller. *Revista Chapingo. Serie Hort.* 7:37-48
- Sargent, P.B. (2000) The distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuronal nicotinic receptors.* 163-184.
- Seidl, R., Tiefenthaler, M., Hauser, E., Lubec, G. (2000) Effects of transdermal nicotine on cognitive performance in Down's syndrome. *Lancet.* 356: 1409-10.
- Smith, C.J., Giacobini, E. (1992) Nicotine, Parkinson's and Alzheimer's disease. *Rev Neurosci.* 3: 25-43.
- Soreq, H., Seidman, S (1999) *Xenopus* oocyte microinjection: from gene to protein. *Methods Enzymol.* 225-65
- Soto, H.M. (1989) Chemical and structural studies of *Erythrina* alkaloids. Ph.D. Thesis, United Kingdom: University of Wales.
- Soto, H.M., Jackson A.H. (1994) *Erythrina* alkaloids: isolation and characterization of alkaloids from seven *Erythrina* species. *Planta Medica* 60: 175-177.

- Soto, H.M., San Miguel C. (2006) Antifungal activity of alkaloid extract of *Erythrina coralloides* A. DC. Against five phyto pathogen fungi. *Planta Medica*. 72:961-1089.
- Unwin, N.(2000) The croonian lecture 2000. Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of fast synaptic transmission. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 355:1813-1829.
- Unwin, N.(2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of Molecular Biology*. 346(4):967-989.
- Vázquez, P., Bonilla, J.H. (2004) Receptores nicotínicos cerebrales y trastornos neuropsiquiátricos. *Rev. Neurol*. 39 (12):1146-1160.
- Wada, E., Wada, K., Boulter, J., Deneris, E. Heinemann, S., Patrick, J. Swanson, W. J. (1989) *Comp Neurol*. 284, 314-335.
- Wang, H.Y., Lee, D.H., D'Andrea, M.R., Peterson, P.A., Shank, R.P., Reitz, A.B. (2000) Beta-amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J. Biol Chem*. 275: 5626-32.
- Warburton, D.M., Rusted, J.M., Fowler, J.A. (1992) Comparison of the attentional and consolidation hypotheses for the facilitation of memory by nicotine. *Psychopharmacology*. 108: 443-50.
- Waxhman, M.N. (1999) Neurotransmitter Receptors. En: *Fundamental Neuroscience*. Michael J. Zigmond, Bloom, Roberts y Squire. 235-367.
- Zolí, M. (2000) Neuronal nicotinic acetylcholine receptors in development and aging. *Neuronal nicotinic receptors* . 213-237.