



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EFFECTO DEL ANTAGONISTA NICOTÍNICO
ERISODINA SOBRE LA CONSOLIDACIÓN DE LA
MEMORIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MARÍA NAYELI GARCÍA MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA EUGENIA GARÍN AGUILAR



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

La elaboración de este trabajo ha sido un proceso que como el escritor Jesús Mendoza citó “La vida es una onda con distintas magnitudes y amplitudes. El fin de ésta es aprender de los valles y vivir en el cenit”, y claro está que esta tesis ha sido una onda, agradezco de todo corazón a todas las personas que no menciono aquí pero que me ayudaron a aprender de los valles y llegar al cenit.

Me resultaría incorrecto comenzar con la lista de aquellos personajes con los que estaré infinitamente agradecida, sin antes mencionar a los verdaderos protagonistas de esta labor, protagonistas que sin más fueron los sujetos de experimentación, 46 animales de laboratorio a los que debo el conocimiento práctico experimental.

Quisiera resaltar el nombre de la doctora María Eugenia Garín Aguilar, directora de la tesis quien ha sido, abusando de redundar, el cauce correcto a la correcta elaboración de este trabajo. Quien estuvo conmigo en las largas y extenuantes jornadas de trabajo. Quien ha sido la guía bienintencionada. Quien siempre creyó en mí y en mis capacidades.

De todo corazón quiero agradecer a mi madre Sonia Mendoza Rodríguez, quien fuera el pilar y base de mis estudios, por tantos años de esfuerzo y entusiasmo que siempre ha caracterizado su pasión por la ciencia y ver a su hija lograrlo.

Quedaría incompleta esta redacción sin el nombre de quien ha sido el reflejo de la experiencia que “El éxito no es cuestión de suerte sino resultado de tu esfuerzo”, y que sin duda alguna siempre ha compartido conmigo, mi padre Antonio García González.

Y como todo buen trabajo necesita del amor agradezco a mis hermanos Joshua García Mendoza y Brandom García Mendoza por su comprensión, ayuda incondicional y amor que me han brindado siempre que lo he necesitado.

A Michel González Guillén, quién proporcionó ese impulso que dotó de energía y motivación, el esfuerzo requerido para la culminación de este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia escolar “herbacea” quienes rápidamente se convertirían en mis compañeros de experiencias académicas y personales. Pero sobre todo por haber estado hombro con hombro hasta este punto de mi vida.

DEDICATORIA

Este trabajo de Tesis está dedicado a esas personas que siempre estuvieron ahí apoyándome emocional y económicamente, quienes con el sudor de su frente, tiempo y empeño me han ayudado hasta esta etapa de mi vida. Estoy eternamente agradecida y lucharé por regresarles aunque sea un poco de lo mucho que me han brindado. Sonia y Antonio, mis padres.

También dedico mi tesis a esos jovencitos que siempre me escucharon, me comprendieron y dieron lo mejor de cada uno. Brandon y Joshua, mis grandiosos hermanos.

Esta tesis también la dedico de todo corazón, al gran ser humano que se involucró amablemente en la realización del trabajo experimental, el Ing. Eduardo Molina, un gran caballero. Quien siempre se esmeró en mantener en excelente estado y funcionamiento la cámara de evitación y su interfase.

Por supuesto, también dedico esta tesis a la persona que no dudó en que yo lograra concluir mi carrera, siempre me apoyo, tanto personal, económica y académicamente. Dra. María Eugenia, excelente asesora y amiga.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE

Dr. Gustavo Valencia del Toro

VOCAL

Dr. Jorge Ricardo Gersenowies Rodríguez

SECRETARIO

Dra. María Eugenia Garín Aguilar

SUPLENTE

Dr. José Guillermo Ávila Acevedo

SUPLENTE

Mtra. Leonor Ana María Abundiz Bonilla

El presente proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Farmacobiología (L-514) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Garín Aguilar y con el apoyo del Programa de Apoyo a Profesores de Carrera para la Formación de Grupos de Investigación (PAPCA 2006-2007 y 2007-2008 FES-Iztacala, UNAM) Proyecto No. 42 y 78; así como por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA, UNAM) IN212906-3.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. GENERALIDADES	6
II.1. Aprendizaje y Memoria.....	6
II.2. Fases de la memoria.....	6
II.2.1. Atención.....	6
II.2.2. Codificación.....	6
II.2.3. Almacenamiento.....	6
II.2.4. Evocación.....	7
II.3. Etapas de la memoria.....	7
II.3.1. Memoria de corto y largo plazo.....	8
II.3.2. Memoria explícita o declarativa.....	10
II.3.3. Memoria implícita o no declarativa.....	10
II.3.4. Memoria de trabajo.....	11
II.3.5. Consolidación de la memoria.....	12
II.4. Hipocampo.....	12
II.4.1. Formación hipocámpica.....	13
II.4.2. Vías aferentes del hipocampo.....	14

II.4.3. Vías eferentes del hipocampo.....	15
II.4.4. Tipos celulares en la formación hipocámpica.....	16
II.4.5. Circuito trisináptico hipocámpico.....	18
II.4.6. Neurotransmisores en el hipocampo.....	19
II.4.6.1. Glutamato.....	20
II.4.6.2. Ácido γ -aminobutírico (GABA).....	20
II.4.6.3. Serotonina.....	20
II.4.6.4. Dopamina.....	21
II.4.6.5. Noradrenalina.....	21
II.4.6.6. Acetilcolina.....	21
II.4.7. Acetilcolina (ACh) y sus receptores.....	22
II.4.8. Receptores acetil colinérgico nicotínicos (nAChR).....	23
III. ANTECEDENTES.....	26
III.1. Memoria.....	26
III.2. Hipocampo y memoria.....	26
III.3. Acetilcolina y memoria.....	28
III.4. nAChR y memoria.....	29
III.5. Trastornos del sistema nervioso y nAChR.....	33
IV. JUSTIFICACIÓN.....	38
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	38
VI. HIPÓTESIS.....	38
VII. OBJETIVO.....	38
VII.1. Objetivo general.....	38
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
VIII.1. Material vegetal.....	39

VIII.2. Extracción de alcaloides.....	39
VIII.3. Aislamiento y purificación.....	39
VIII.4. Animales.....	39
VIII.5. Cirugía.....	40
VIII.6. Manipulación.....	40
VIII.7. Aparato y Procedimiento.....	40
VIII.8. Fármacos e infusión.....	41
VIII.9. Perfusión.....	41
VIII.10. Histología.....	41
VIII.11. Análisis estadístico.....	42
IX. RESULTADOS.....	43
IX.1. <i>Erythrina americana</i>	43
IX.2. Espectro de resonancia magnética.....	43
IX.3. Verificación de la ubicación de las cánulas.....	43
IX.4. Etapa de entrenamiento.....	44
IX.5. Etapa de prueba.....	48
X. DISCUSIÓN.....	51
XI. CONCLUSIONES.....	56
XII. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO.....	57
XIII. REFERENCIAS.....	58
XIV. ANEXOS.....	73
ANEXO 1. <i>Erythrina</i>.....	73
XIV.1.1. Distribución y usos.....	73
XIV.1.2. Alcaloides presentes en <i>Erythrina</i>	75
XIV.1.3. <i>Erythrina americana</i>	76
XIV.1.3.1. Características y distribución en México.....	76

ANEXO 2. Modelos animales.....	78
XIV.2.1. Modelos en el estudio de la memoria y el aprendizaje..	78
XIV.2.1.1. Prueba de reconocimiento de objetos.....	79
XIV.2.1.2. Prueba de reconocimiento social.....	80
XIV.2.1.3. Memoria espacial.....	81
XIV.2.1.3.1. Laberinto acuático de Morris.....	81
XIV.2.1.3.2. Laberinto de Barnes.....	82
XIV.2.1.4. Memoria emocional.....	83
XIV.2.1.4.1. Condicionamiento aversivo al sabor..	83
XIV.2.1.5. Aprendizaje asociativo.....	84
XIV.2.1.5.1. Prueba de evitación activa.....	84
XIV.2.1.5.2. Prueba de evitación pasiva.....	84
XIV.2.1.5.2.1. Cámara de evitación inhibitoria.....	84
ANEXO 3. Procedimiento de cirugía.....	87
ANEXO 4. Análisis químico.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama del modelo de Atkinson y Shiffrin.....	7
Figura 2. Clasificación de los sistemas de memoria de largo plazo.....	9
Figura 3. Posición de la formación hipocámpica en el cerebro de rata.....	13
Figura 4. Esquema de las vías aferentes del hipocampo.....	14
Figura 5. Esquema de las vías eferentes del hipocampo.....	15
Figura 6. Principales regiones citoarquitectónicas de la FH.....	16
Figura 7. Neuronas piramidales del hipocampo.....	17
Figura 8. Esquema de la formación hipocámpica.....	19
Figura 9. Principales conexiones subcorticales del hipocampo de rata.....	22
Figura 10. Estructura química de la Acetilcolina.....	22
Figura 11. Mapa de la distribución de los nAChR en el SNC de rata.....	25
Figura 12. Tipos de receptores colinérgicos neuronales.....	30
Figura 13. Estructura del receptor nicotínico.....	31
Figura 14. Estructura y lugar de unión agonista/antagonista al receptor.....	32
Figura 15. Estructura del receptor nicotínico desde la hendidura sináptica..	33
Figura 16. Ejemplar de <i>Erythrina americana</i>	43
Figura 17. Microfotografía y esquema del corte coronal en HV.....	44
Figura 18. Gráfica de los valores de latencia de adquisición de los grupos..	46
Figura 19. Gráfica de los valores de latencia de escape de los grupos.....	47
Figura 20. Gráfica de los valores de latencia de retención de los grupos.....	50
Figura 21. Distribución del género <i>Erythrina</i> en el mundo.....	74
Figura 22. Principales familias químicas de <i>Erythrina</i>	74
Figura 23. Distribución de <i>Erythrina americana</i> en México.....	76
Figura 24. Modelo de prueba de reconocimiento de objetos.....	79

Figura 25. Modelo de prueba de reconocimiento social.....	80
Figura 26. Modelo de laberinto acuático de Morris.....	81
Figura 27. Modelo de laberinto de Barnes.....	82
Figura 28. Modelo de condicionamiento aversivo al sabor.....	83
Figura 29. Esquema de la cámara de evitación inhibitoria.....	85
Figura 30. Forma en que fue colocada la rata en el estereotáxico.....	87
Figura 31. Colocación de las cánulas.....	87
Figura 32. Esquema del corte de cerebro de rata a la altura del HV.....	87
Figura 33. Desplazamientos químicos del alcaloide Erisodina.....	88
Figura 34. Espectro de ¹ HMNR para Erisodina.....	89

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Agonistas y antagonistas de los receptores nicotínicos.....	36
Cuadro 2. Mediana de las latencias de adquisición y escape de los grupos	44
Cuadro 3. Mediana de las latencias de retención de los grupos.....	49

ABREVIATURAS

ACh.....	Acetilcolina
AChE.....	Acetil colin esterasa
A-P.....	Antero – Posterior
BBB.....	Barrera hematoencefálica
CA.....	Cornus Ammonis
CAT.....	Colina acetiltransferasa
CC.....	Cromatografía en columna
CCF.....	Cromatografía en capa fina
Dh β E.....	Dihidro beta eritroidina
D-V.....	Dorso – Ventral
EA.....	Enfermedad de Alzheimer
<i>E. americana</i>	<i>Erithryna americana</i>
EDINA.....	Erisodina
FH.....	Formación hipocámpica
GABA.....	Ácido- γ -amino butírico
HC.....	Hipocampo
HD.....	Hipocampo dorsal
HV.....	Hipocampo ventral
LTP.....	Potenciación de largo plazo
LTD.....	Depresión de largo plazo
MCP.....	Memoria de corto plazo
ME.....	Memoria explícita
MI.....	Memoria implícita
mGluR.....	Receptor metabotrópico glutamatérgico
M-L.....	Medio – Lateral
MLA.....	Metilicaconitina

MLP.....	Memoria de largo plazo
MT.....	Memoria de trabajo
n.....	Número de sujetos experimentales
nAChR.....	Receptor acetil colinérgico nicotínico
Nic.....	Nicotina
RMN-H ¹	Resonancia magnética nuclear de hidrogeno
RPM.....	Revoluciones por minuto
nAChR.....	Receptores acetil colinérgico nicotínicos neuronales
mAChR.....	Receptores acetil colinérgico nicotínicos musculares
SAL.....	Salina
SNC.....	Sistema nervioso central
SM.....	Segmentos transmembrana
TTX.....	Tetrodotoxina

RESUMEN

Hay evidencias de la participación del sistema colinérgico en los procesos mnemónicos. Dihidro- β -eritroidina (DH β E) es un antagonista colinérgico, empleado para estudiar el papel del receptor nicotínico neuronal α 4 β 2, el cual está implicado en los procesos de atención y memoria; sin embargo, este antagonista también presenta afinidad a otros receptores como α 7, α 3 β 4 y α 3 β 2. Se ha indicado que Erisodina, otro antagonista nicotínico presenta siete veces más afinidad al receptor α 4 β 2 que su análogo DH β E, lo que convierte al alcaloide Erisodina en una herramienta útil para la caracterización funcional de este receptor. Por tal motivo, en este estudio se aisló Erisodina de semillas de *Erythrina americana* y se le usó para determinar la participación del receptor α 4 β 2 en la consolidación de la memoria. Para la prueba conductual 46 ratas macho Wistar (250-350g) se distribuyeron al azar en grupos independientes (n = 6 - 13) para implantarles cánulas bilaterales dirigidas al hipocampo ventral (AP = - 5.1, ML = \pm 4.8, DV = - 7.4). Ocho días después de la cirugía, fueron entrenadas en una tarea de evitación inhibitoria recibiendo en las extremidades un choque eléctrico de 0.8 mA. Inmediatamente después del entrenamiento, los animales recibieron uno de los siguientes tratamientos: nicotina (2.0 μ g / μ L), DH β E (2.0 μ g / μ L), Erisodina (2.0, 6.0 μ g / μ L) o solución salina (1.0 μ L / min). La prueba de retención se realizó a las 24 h. Los resultados indicaron que el agonista colinérgico nicotina, no deterioró la memoria mientras que los antagonistas DH β E y Erisodina impidieron la consolidación de la tarea de evitación. Se ha reportado que erisodina presenta mayor afinidad a los receptores nicotínicos α 4 β 2, sin embargo, en este estudio se encontró que el deterioro de la memoria fue significativamente mayor con DH β E que con erisodina, esto sugiere la posibilidad de que los otros receptores a los que DH β E es afín (α 3 β 4, α 3 β 2 y α 7), ocasionan un deterioro adicional en la consolidación de la memoria; sin embargo, es necesario someter esta hipótesis a prueba experimental. Finalmente, este estudio evidenció que los receptores nicotínicos α 4 β 2 localizados en el hipocampo ventral participan de manera significativa en la consolidación de memoria.

PALABRAS CLAVE: consolidación, Dihidro- β -eritroidina, Erisodina, evitación inhibitoria, antagonistas nicotínicos.

ABSTRACT

There is evidence of involvement of the cholinergic system in mnemonic processes. Dihydro- β -erythroidine (DH β E), cholinergic antagonist, is used to study the role of α 4 β 2 neuronal nicotinic receptor, which is involved in the processes of attention and memory; however, this antagonist also has affinity to α 7, α 3 β 4 and α 3 β 2 nicotinic receptors. It has been indicated Erysodine, another nicotinic antagonist, has 7-fold greater affinity by α 4 β 2 receptor than its analog DH β E, so Erysodine alkaloid can be an important tool for functional characterization of nicotinic acetylcholine receptors. Therefore, in this study Erysodine was isolated from *Erythrina americana* seed and was used to determine the involvement of α 4 β 2 receptor in memory consolidation. For behavioral test 46 male Wistar rats (250-350 g) were distributed randomly into independent groups (n = 6-13) and cannulas were bilaterally implanted into the ventral hippocampus (AP = - 5.1, ML = \pm 4.8, DV = - 7.4). Eight days after surgery, they were trained in inhibitory avoidance task with 8.0 mA extremities-shock. Immediately after training, the animals received one of the following treatments: nicotine (2.0 μ g / μ L), DH β E (2.0 μ g / μ L), Erysodine (2.0, 6.0 μ g / μ L) or saline (1.0 μ L / min). The retention test was performed at 24 h. The results indicated that the cholinergic agonist nicotine did not impair the memory, while Erysodine and DH β E antagonists prevented consolidation avoidance task. It has been reported that Erysodine has more affinity for α 4 β 2 nicotinic receptors, however, in this study it was found that memory impairment was significantly greater with DH β E than Erysodine, this suggests the possibility of other receptors to which DH β E is affine (α 3 β 4, α 3 β 2 and α 7), yield a further deficit in memory consolidation; however, this hypothesis should be tested. Finally, this study showed that α 4 β 2 nicotinic receptors into ventral hippocampus are significantly involved in memory consolidation.

KEY WORDS: consolidation, Dihydro- β -erythroidine, Erysodine, inhibitory avoidance, nicotinic antagonists

I. INTRODUCCIÓN

Junto a las fuerzas selectivas de la evolución, el aprendizaje y la memoria son el medio principal de adaptación de los seres vivos a las variaciones de su medio ambiente (Morgado, 2005). Las diversas definiciones de aprendizaje coinciden en que este proceso es un cambio relativamente permanente, en la conducta de un sujeto, que resulta de la experiencia (Bower & Hilgard, 2011), por otro lado la memoria se refiere a la persistencia del aprendizaje en un estado que puede ser revelado un tiempo después (Squire, 1987). De acuerdo con los estudios de Atkinson y Shiffrin (1968) la memoria ha sido considerada como un proceso que implica las siguientes etapas: codificación de la información, consolidación y evocación de la memoria.

La memoria es un proceso complejo que no se encuentra localizado sino que involucra numerosas áreas del cerebro (Ruiz & Lopera, 2008), los diversos estudios de daño en el hipocampo (HC) de primates han sugerido que éste participa en la asociación de la información proveniente de diferentes regiones corticales (Maguire *et al.*, 1996; Rolls, 1996). En la rata, se ha demostrado que el HC participa en la memoria espacial y juega un papel esencial en los procesos de integración (Sharp, 1997; McNaughton *et al.*, 1996; Maaswinkel & Whishaw, 1999) y en la consolidación del aprendizaje (Morris *et al.*, 1982; Olton, 1983; Olton & Papas, 1979; Vann *et al.*, 2000).

El HC se subdivide en dorsal (HD) y en ventral (HV), no sólo morfológicamente, sino también en su conectividad por ejemplo, se han visto algunas diferencias funcionales; atribuyendo al HD una mayor participación en el procesamiento de la memoria espacial. Así mismo se ha observado que el efecto de la inactivación del HV antes de la recuperación de la tarea aprendida es seguido por un efecto amnésico más marcado que el causado por la inactivación del DH con tetrodotoxina (TTX). Por lo tanto, HV parece desempeñar un papel más importante en la recuperación de la información que HD, todos estos hallazgos pueden tomarse como una indicación de independencia funcional relativa de HD e HV, al menos en relación con la evitación inhibitoria condicionada

(Ambrogio-Lorenzini *et al.*, 1997). Por otro lado de algún interés también puede ser el análisis de las analogías funcionales, si las hay, de la estructura neural actualmente investigada y de otros, como la amígdala, ya que se sabe que está íntimamente conectada con el hipocampo, y que participan en los procesos de memorización de respuesta de evitación pasiva en rata, además dichas conexiones amígdala-hipocampo parecen ir casi exclusivamente al HV (Ambrogio-Lorenzini *et al.*, 1997).

Con respecto a la bioquímica, los estudios experimentales, así como los clínicos en humanos resaltan la participación de diversos neurotransmisores relacionados con la memoria entre los que encontramos a; glutamato, GABA, serotonina, dopamina, noradrenalina, destacándose principalmente la acetilcolina (ACh) (Solís & López-Hernández, 2009), ya que la ACh regula la capacidad para retener una información, almacenarla y recuperarla en el momento necesario, los niveles altos de acetilcolina potencian la memoria, la concentración y la capacidad de aprendizaje (Dávila, 2013). En un estudio reciente realizado por Almaguer (2014) se observó que la estimulación eléctrica de la amígdala induce un incremento en la liberación de ACh en el giro dentado del HC, lo cual sugiere que este neurotransmisor pudiera ser clave en la consolidación de la potenciación a largo plazo (LTP) en el HC.

Por otra parte en 1976 se hizo pública la primera anomalía bioquímica asociada con la enfermedad de Alzheimer (EA), encontrándose en HC y en la corteza cerebral de los enfermos, que la enzima colina acetil transferasa (CAT) presentaba niveles inferiores hasta 90% de lo normal (Flores & Segura, 2005). Abundantes datos sugieren que las terminales colinérgicas del HC son de importancia crítica para la formación de la memoria, por lo tanto, es plausible emitir la hipótesis de que algunos de los defectos cognitivos de la EA son resultados directos de la reducción de la neurotransmisión dependiente de la ACh en esta estructura (Reiner & Fibiger, 2000).

La ACh ejerce sus efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP) a través de dos tipos distintos de receptores de ACh: los receptores muscarínicos y los receptores nicotínicos (mAChRs y nAChR,

respectivamente). Los nAChR están involucrados en una serie de procesos conectados a las funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria. Los nAChR $\alpha 4\beta 2$ son los receptores caracterizados por su alta afinidad vinculante a ACh, además de ser las subunidades de nAChR predominantes en el SNC (aproximadamente 90%). Sin embargo, la falta de ligandos selectivos de subtipo de nAChR ha complicado las investigaciones de los papeles fisiológicos de los subtipos específicos de nAChR (Jensen *et al.*, 2005).

El desarrollo de agonistas y antagonistas nicotínicos diferencialmente selectivos podrían proporcionar información más completa sobre la participación de la diversidad tan amplia de los subtipos de receptores nicotínicos sobre la memoria (Levin *et al.*, 2002), para establecer el papel específico de los subtipos de nAChR en la función fisiológica y así desentrañar las complejidades de la función de los receptores nicotínicos neuronales. Además, estos antagonistas selectivos también podrían resultar benéficos en el tratamiento de neuropatologías (Dwoskin & Crooks, 2001). Y dado que existe un gran número de informes que demuestran que la administración sistémica de drogas anticolinérgicas interfieren con la formación de la memoria (Quirarte & Prado-Alcalá, 2004) se hace necesario una investigación que nos ayude a comprender la manera en que los receptores nicotínicos del HV participan en los procesos mnemónicos, específicamente en este estudio, en la consolidación de la memoria.

La mayoría de los antagonistas de los nAChR se han obtenido a partir de fuentes naturales (Jensen *et al.*, 2005) tal es el caso de Erisodina, un antagonista extraído de semillas de *Erythrina americana* recientemente reportado por Decker y colaboradores (1995) con siete veces mayor afinidad por el subtipo de receptor $\alpha 4\beta 2$ en comparación con el antagonista de uso común DH β E (compuesto químico derivado de β -eritroidina) y con el cual guarda una relación en cuanto a estructura química.

Dicho lo anterior, en el presente estudio se evaluó el efecto que causa el antagonista Erisodina sobre los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del HV, en la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

II. GENERALIDADES

II.1. Aprendizaje y Memoria

De acuerdo con Bower y Hilgard (2011) el aprendizaje se refiere al cambio en la conducta o en el potencial de conducta de un sujeto en una situación dada como producto de sus repetidas experiencias en esa situación, siempre que el cambio conductual no pueda explicarse con base en sus tendencias de respuesta innatas, su maduración, o estados temporales (como la fatiga, la intoxicación alcohólica, los impulsos, etcétera). La memoria, por otra parte, se refiere a la persistencia del aprendizaje en un estado al que se pueda acceder posteriormente (Squire, 1987), la memoria es la prueba de haber aprendido, es decir, es el conocimiento de una experiencia pasada.

II.2. Fases de la memoria

Cualquier sistema de almacenaje de información, sea biológico o artificial, precisa, además de un nivel mínimo de atención: ser capaz de codificar o registrar la información; almacenarla, preferiblemente sin mucha pérdida u olvido y, consecuentemente, poder recuperar o acceder a esa información (Gramunt, 2008).

II.2.1. Atención: Es la capacidad que inicialmente permite la entrada de información (Howieson & Lezak, 2002).

II.2.2. Codificación: A veces también denominado registro. Es el proceso inicial por el que la información física se transforma en una representación mental almacenada (Delis & Kramer, 2000).

II.2.3. Almacenamiento: Se refiere al mantenimiento de la información para poder acceder a ella cuando se requiera. Supone una transferencia de una memoria transitoria a una forma o ubicación cerebral para su retención permanente o posterior acceso (Gramunt, 2008). Milner (1966) describió este fenómeno como un proceso posterior a la codificación que, presumiblemente, media en la transición de la memoria del almacén a corto plazo a un almacén más permanente y estable a largo plazo.

El olvido puede ser entendido, como un reflejo de la pérdida de información con el paso del tiempo (Gramunt, 2008). Hacia la mitad del s. XX se dedicó mucha atención a tratar de decidir si el olvido resultaba del desvanecimiento espontáneo de huellas mnésicas con el tiempo, o como resultado de la interferencia de otros aprendizajes. En relación a la última opción, destacan dos términos relevantes: la interferencia retroactiva, que es la pérdida de información memorizada a causa de un aprendizaje posterior, y la interferencia proactiva, que es la interferencia provocada por una memoria previa en el aprendizaje de nueva información (Baddeley, 1995).

II.2.4. Evocación: Representa el proceso consciente de acceso a la información almacenada (Delis & Kramer, 2000).

II.3. Etapas de la memoria

De acuerdo con los estudios de Atkinson y Shiffrin (1968) la memoria ha sido considerada como un proceso que implica las siguientes etapas: registro o codificación de la información (a través de nuestros sentidos, específicamente vista y oído, conocidos como memoria icónica y ecoica respectivamente); consolidación o almacenamiento (memoria de corto plazo-MCP); y finalmente la evocación, recuperación o decodificación de la memoria (memoria de largo plazo-MLP) Ver Figura 1.

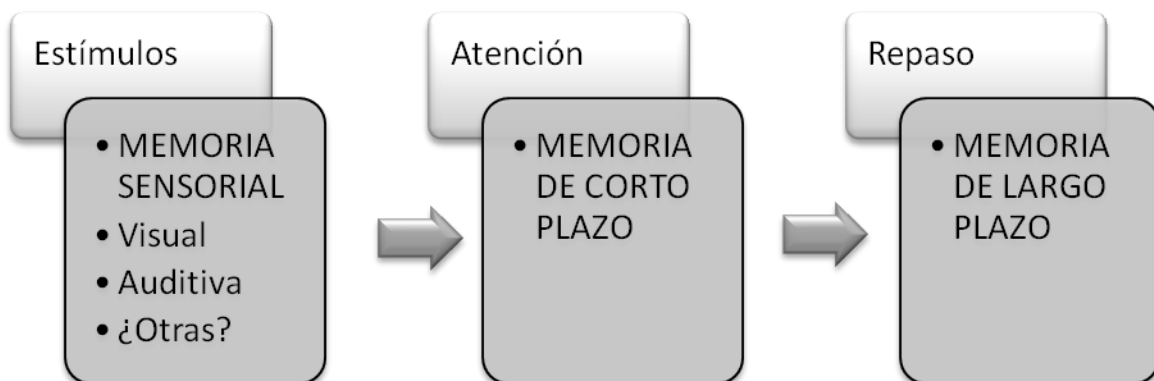


Figura 1. Diagrama simplificado del modelo de Atkinson y Shiffrin (1968) sobre el almacenamiento de la memoria en tres etapas. La interpretación y organización de las experiencias se lleva a cabo durante la segunda etapa, o memoria de corto plazo. La etapa final, o memoria de largo plazo, constituye el lugar de almacenamiento permanente o casi permanente en la memoria.

II.3.1. Memoria de corto y largo plazo

Williams James distingue y divide a la memoria en dos categorías, la memoria de corto y largo plazo (Téllez, 2003). Por MCP se entiende como el recuerdo de material de forma inmediatamente posterior a su presentación o su recuperación ininterrumpida. Se la cree limitada en su capacidad (Miller, 1956). Por otro lado, cuando se emplea la definición de MLP se hace referencia al recuerdo de información tras un intervalo en el que la atención del sujeto se centra en aspectos distintos del objetivo. Se cree que tiene una gran capacidad de almacenamiento (Gramunt, 2008).

En la Figura 2 se esquematiza una clasificación de los sistemas de MLP en mamíferos señalando las estructuras cerebrales que se han considerado especialmente importantes para cada forma de memoria declarativa y no declarativa (Squire, 2004).

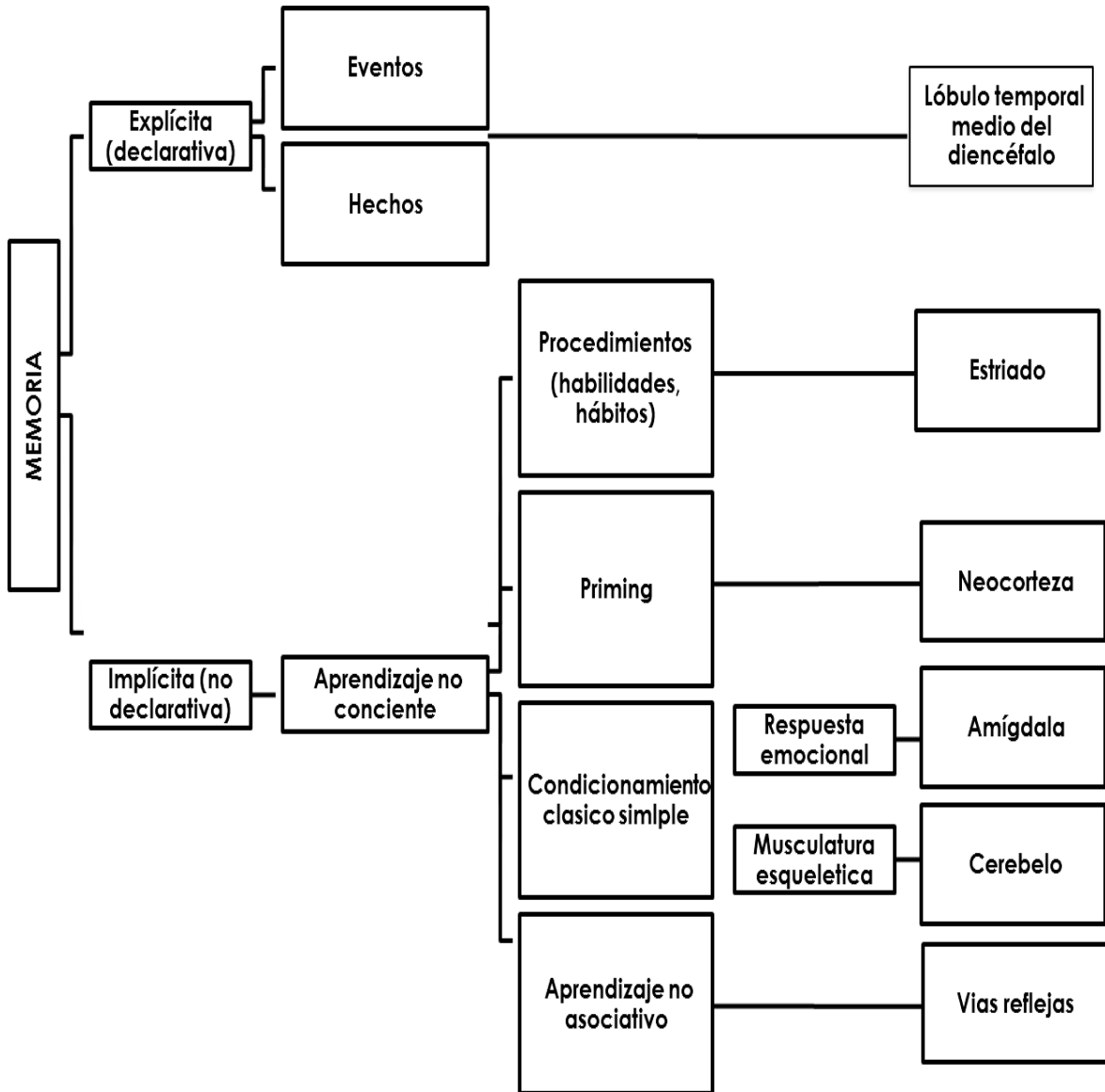


Figura 2. Clasificación de los sistemas de memoria de largo plazo en mamíferos. Modificado de Squire, 2004

En 1986 Larry Squire fue quién nombró a los dos grandes subsistemas que dividen la memoria a largo plazo en: memoria declarativa y memoria procedimental, también denominadas por Graf y Schacter explícita o implícita, respectivamente. Endel Tulving (1972) formuló una nueva clasificación que dividiría la memoria declarativa en memoria episódica y semántica (Costa, 2014).

II.3.2. Memoria explícita o declarativa

La memoria explícita (ME) o declarativa es aquella a la que se refiere tradicionalmente al usar el término memoria (Squire, 2004), pudiendo dividirse en memoria semántica (almacenamiento del conocimiento del mundo) y memoria episódica (capacidad de volver a experimentar un evento en el contexto en el que se produjo originalmente) (Tulving, 1983). Se expresa conscientemente y es fácil de declarar verbalmente o por escrito (Morgado, 2005). La memoria declarativa es proposicional, es decir, puede ser correcta o incorrecta, dado que está involucrada en la manipulación de la información y de las experiencias del mundo externo (Ruetti *et al.*, 2009). El proceso de consolidación de la memoria explícita parece depender del intercambio de información entre el hipocampo y diversas zonas corticales, a través de sistemas bidireccionales de conexiones córtico-hipocampales; asimismo, parece que los sistemas de almacenamiento se localizan a nivel cortical y de nuevo dependerá del hipocampo la reactivación y organización, para su utilización, de esas “memorias corticales” (Aguado-Aguilar, 2001).

II.3.3. Memoria implícita o no declarativa

La memoria implícita (MI), también llamada no declarativa o procedimental, es la información que nos permite ejercer hábitos cognitivos y motores. Es la memoria de las cosas que solemos hacer. Su expresión es en gran medida automática, inconsciente y difícil de verbalizar. Se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica. Suele ser una memoria fiel, rígida y duradera, derivada de tipos de aprendizaje básico y filogenéticamente antiguos, como la habituación y la sensibilización, el aprendizaje perceptivo y motor, o los condicionamientos clásico e instrumental. En humanos se ha demostrado el importante papel de la amígdala en el procesamiento de la memoria implícita ligada a estímulos emocionales (Morgado, 2005).

En la vida diaria las formas elementales de aprendizaje no asociativo son habituación y sensibilización. La habituación es la forma más simple de aprendizaje implícito y se refiere a la disminución de la respuesta a un estímulo benigno cuando este estímulo se presenta repetidas veces; por ejemplo, un sujeto responde primero a un estímulo nuevo prestándole atención con una serie de respuestas de orientación; si el estímulo no es ni benigno ni perjudicial, el sujeto aprende, después de la exposición repetida, a ignorarlo. Es decir; cuando un individuo recibe repetidas veces un estímulo inocuo, aprende a habituarse a él. Por el contrario, con un estímulo nocivo, el sujeto suele aprender a responder más enérgicamente no sólo a ese estímulo, sino también a otros, incluso los inocuos. Los reflejos de defensa retracción y escape se exaltan. Esta facilitación de respuestas reflejas, se denomina sensibilización y es más compleja que la habituación, pues un estímulo aplicado en una vía produce una variación en la intensidad del reflejo de otra vía (Solís & López-Hernández, 2009).

Atendiendo a sus características conductuales y a las estructuras cerebrales implicadas, Baddeley y Hitch han establecido un tercer tipo de memoria aparte de la MI y la ME, y que es la memoria de trabajo (MT) también llamada operativa (Costa, 2014).

II.3.4. Memoria de trabajo

La llamada memoria de trabajo (MT) consiste en la representación consciente y manipulación temporal de la información necesaria para realizar operaciones cognitivas complejas, como el aprendizaje, la comprensión del lenguaje o el razonamiento. Su relevancia se acrecienta por su contribución a la MLP y por su relación con la inteligencia fluida, es decir, con la capacidad de razonamiento general y de resolución de problemas (Morgado, 2005).

La memoria es un proceso complejo que no se encuentra localizado sino que involucra numerosas áreas del cerebro: en el caso de la memoria explícita, su adquisición se relaciona con el sistema hipocámpico y otras estructuras del lóbulo temporal medial del cerebro, pero su almacenamiento definitivo parece radicar en

diferentes áreas de la corteza cerebral, dependiendo del tipo de información: en el caso de la implícita sus principales lugares de almacenamiento son estructuras subcorticales, como el neocórtex (caudado y putamen) (Ruiz & Lopera, 2008).

II.3.5. Consolidación de la memoria

El concepto de consolidación de la memoria fue establecido por Müller y Pilzecker (1900) quienes propusieron que el aprendizaje no induce instantáneamente memorias permanentes sino que la memoria toma tiempo para ser fijada o consolidada. Consecuentemente la memoria permanece vulnerable a la interrupción por un periodo de tiempo después del aprendizaje (Lechner *et al.*, 1999).

La consolidación de la memoria es el proceso relativo a la transición de un sistema de almacenamiento de información lábil y de vida corta a un sistema viable de almacenamiento a largo plazo. El desarrollo de la MLP parece ocurrir sobre períodos de tiempo y puede involucrar eventos bioquímicos que alteran la conectividad sináptica de un modo estable, o cambios morfológicos en la topografía de la conectividad sináptica (Squire & Davis, 1981).

Los innumerables estudios llevados a cabo en pacientes con alteración de memoria, como lo fue el caso clínico de amnesia del paciente de Brenda Milner, el señor H.M. (Bear *et al.*, 2002), conducen a pensar que aunque la participación cerebral en el proceso de la memoria es muy extensa, las distintas zonas no juegan el mismo papel (Gramunt, 2008). Las características de la amnesia de H.M. refuerzan la idea de que la neuroanatomía y los mecanismos neurales, que son la base de la memoria de procedimiento y de la declarativa, así como de la memoria a corto plazo y a largo plazo, no son idénticas (Bear *et al.*, 2002).

II.4. Hipocampo

Los estudios experimentales, así como los clínicos en humanos resaltan, entre las estructuras cerebrales relacionadas con la memoria declarativa las

siguientes: hipocampo, tálamo, amígdala del lóbulo temporal, cuerpos mamilares y al cerebelo, entre otras (Solís & López-Hernández, 2009).

II.4.1. Formación hipocámpica

La formación hipocámpica (FH) es una región especializada de la corteza límbica, localizada en el lóbulo temporal. La FH ocupa el eje septo-temporal, y está constituida por el giro dentado (GD), el HC o Cornus Ammonis (CA), el complejo subicular y la corteza entorrinal (Amaral & Witter, 1989).

En la Figura 3 se muestra la posición de la formación hipocámpica en el cerebro de rata.

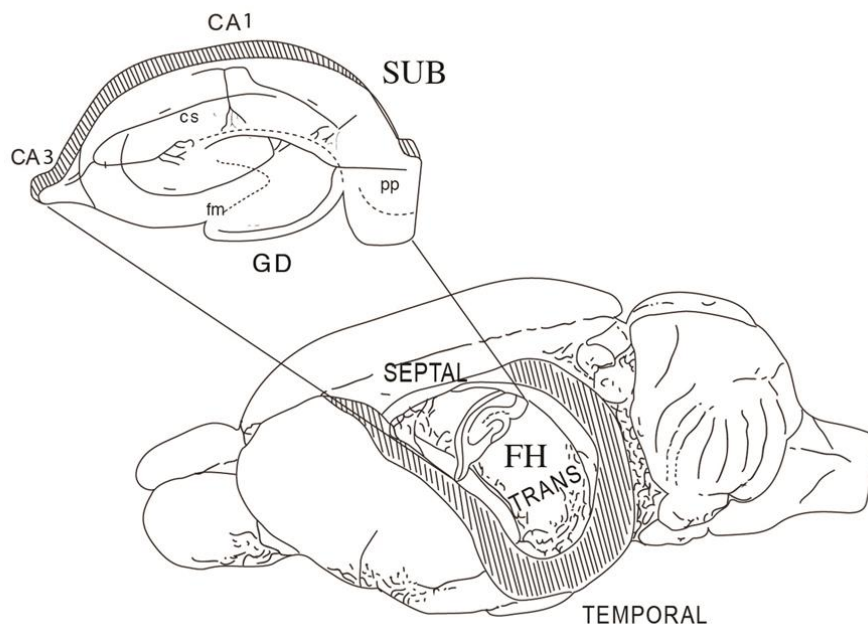
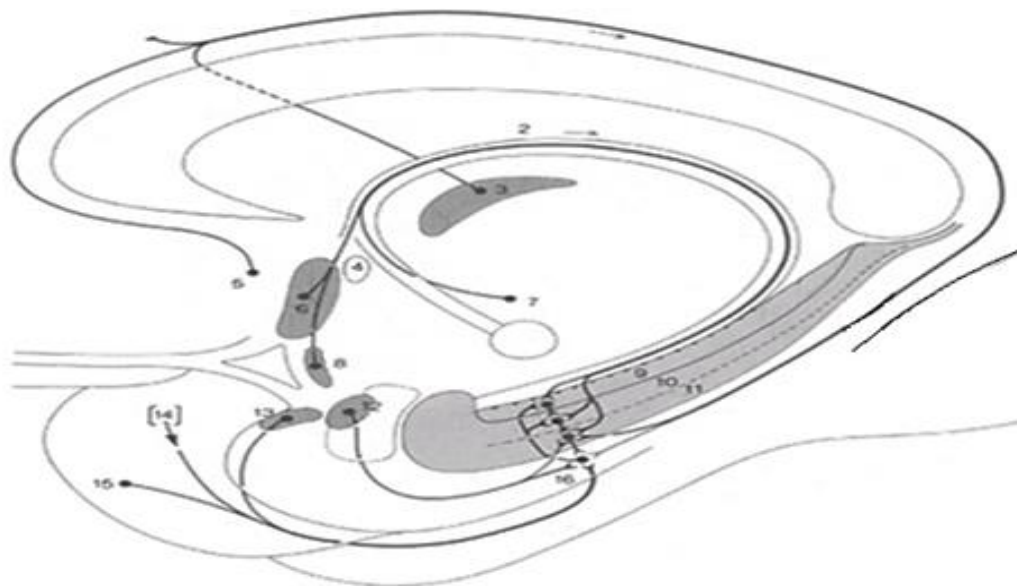


Figura 3. Posición de la formación hipocámpica en el cerebro de rata. En el esquema, la superficie cortical que recubre el hipocampo ha sido removida. El hipocampo es una estructura alargada, en forma de C con el eje largo o septotemporal que va desde el núcleo septal rostral (S) a la corteza temporal (T) ventrocaudal. El eje corto o transversal (TRANS) está orientado perpendicular al eje septotemporal. Los principales campos de la formación hipocámpica (a excepción de la corteza entorrinal) se encuentran en las rebanadas tomadas aproximadamente a medio camino a lo largo del eje septotemporal. El corte representado en la parte superior izquierda es una representación de la síntesis de los principales elementos neuronales y conexiones intrínsecas de la formación hipocámpica. Abreviaturas: GD, giro dentado; fm, fibras musgosas, pp, vía perforante, cs, colaterales de Schaffer (Tomado de Amaral & Witter, 1989 y modificado por Garín, 2014).

II.4.2. Vías aferentes del hipocampo

Las vías aferentes del hipocampo proceden de las cortezas entorrínica, parahipocámpica posterior y prepiriforme y el núcleo central de la amígdala yendo al subículo, el cuerno de Amón y al GD. También hay información que llega de la corteza singular que va al subículo, y de los núcleos del *septum*, el hipotálamo y la corteza entorrínica, por la comisura del trígono, al hipocampo contralateral. Además, del *septum* y los núcleos de la banda diagonal de Broca llegará información por el fórnix al cuerno de Amón, el GD y el subículo. El hipocampo ventricular, lateral y supramamilar y el núcleo talámico anterior, éste último por intermedio del cíngulo, descargan en el hipocampo. Otras aferencias al hipocampo provienen de la parte rostral del mesencéfalo, el núcleo interpeduncular y el *locus coeruleus*, así como el núcleo reticular superior central dorsal del rafé y dorsal tegmental (Ver Figura 4) (Castro *et al.*, 2007).



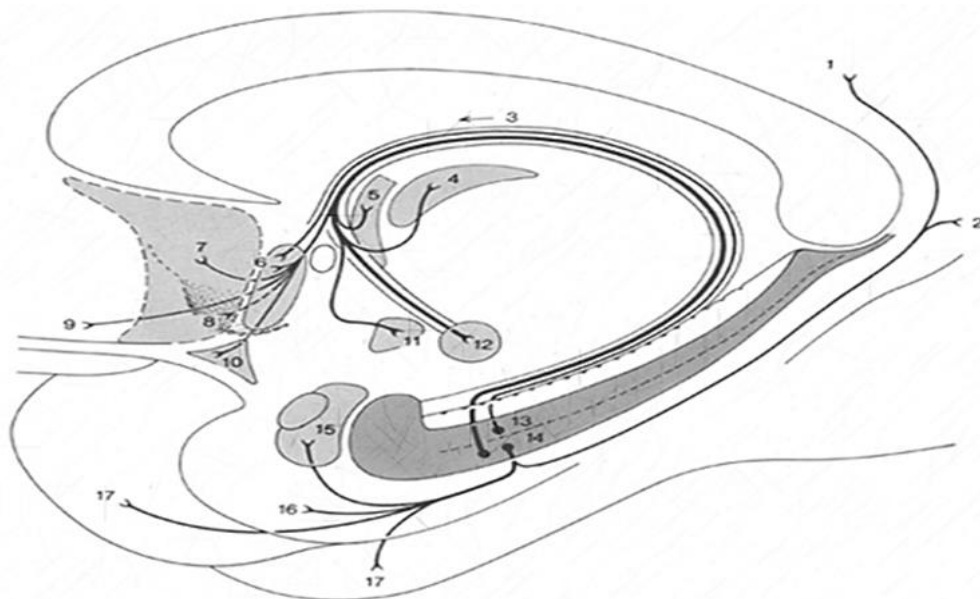
- | | |
|--------------------------------|---|
| 1.- Cíngulo | 9.- Fascia dentada |
| 2.- Fórnix | 10.- Cuerno amoniano |
| 3.- Núcleo anterior del tálamo | 11.- Subículo |
| 4.- Comisura anterior | 12.- Núcleos cortical y medial del cuerpo. amigdalino |
| 5.- Área subcallosa | 13.- Corteza prepiriforme |
| 6.- Núcleos septales | 14.- Corteza frontal |
| 7.- Hipotálamo | 15.- Corteza temporal |
| 8.- Núcleo del giro dentado | 16.- Giro parahipocámpico |

Figura 4. Esquema de las vías aferentes del hipocampo (Tomado de Castro *et al.*, 2007).

II.4.3. Vías eferentes del hipocampo

El origen del fórnix que, en su contingente retrocomisural, llevará 56% del total de las fibras. Después de su conexión con el cuerpo mamilar ipsilateral y por medio del haz mamilotalámico de Vicq d'Azyr, descargará en los núcleos talámicos anteriores.

El contingente fornical precomisural irá hacia áreas y núcleos septales, núcleo accumbens, núcleo olfatorio anterior y núcleos preópticos. El contingente supracomisural irá a la corteza ístmica y la corteza cingular, y las áreas y los núcleos septales. El subículo se proyectará a las cortezas frontal, entorrinal, perirrinal, temporal medial, retrosplenial, cingular y prefrontal, así como a los núcleos amigdalinos (Ver Figura 5) (Castro *et al.*, 2007).



- | | |
|----------------------------------|--------------------------------|
| 1.- Giro cingulado | 10.- Núcleo olfatorio anterior |
| 2.- Corteza | 11.- Núcleo ventromedial |
| 3.- Fórnix | 12.- Cuerpo mamilar |
| 4.- Núcleo anterior del tálamo | 13.- Cuerno amonias |
| 5.- Núcleo de la estría terminal | 14.- Subículo |
| 6.- Núcleo septal lateral | 15.- Cuerpo amigdaloides |
| 7.- Corteza frontal medial | 16.- Corteza entorrinal |
| 8.- Núcleo accumbens | 17.- Corteza temporal |
| 9.- Giro recto | |

Figura 5. Esquema de las vías eferentes del hipocampo (Tomado de Castro *et al.*, 2007).

II.4.4. Tipos celulares en la formación hipocámpica

La FH comprende seis regiones distinguibles citoarquitectónicamente, conectadas de forma unidireccional: el hipocampo, formado por el hipocampo propio y el giro dentado (GD) (separados por la fisura hipocámpica); el complejo subicular, formado por el presubiculum, el subiculum y el parasubiculum; y la corteza entorrinal (Amaral & Witter, 1989) Ver Figura 6.

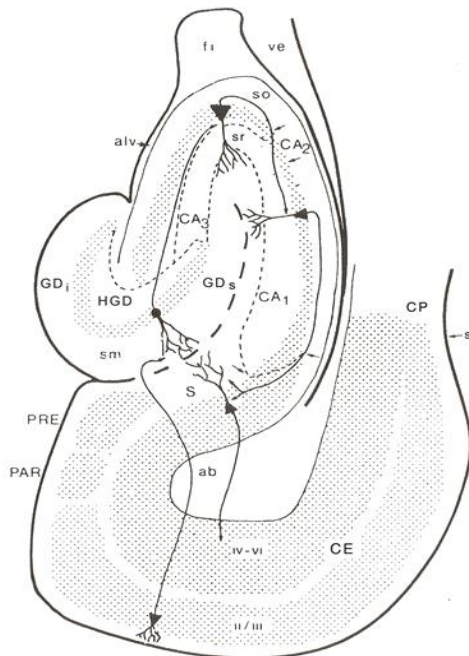


Figura 6. Principales regiones citoarquitectónicas de la formación hipocámpica: Giro dentado (GD); hipocampo dividido en CA1, CA2 y CA3; complejo subicular (subiculum S, pre PRE y para subiculum PAR) y corteza entorrinal (CE) (Tomado de Amaral & Witter, 1989 y modificado por Garín, 2014).

El GD está formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas, stratum granulare (donde residen las células granulares). Estas neuronas son de naturaleza glutamatérgica y poseen axones basales denominados fibras musgosas. En la capa más cercana a la fisura hipocámpica, stratum moleculare o capa molecular, se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales. La capa más profunda del GD, designada hilus, se caracteriza por su naturaleza polimórfica, compuesta por una gran variedad de

tipos celulares (Amaral & Witter, 1989). Entre el stratum granulare y el hilus se puede distinguir una fina capa, la capa subgranular, compuesta por precursores neurales que poseen actividad proliferativa durante la vida adulta.

El hipocampo propio o cuerno de Amón está dividido en tres áreas: CA1 (Cuerno de Amón 1), CA2 (Cuerno de Amón 2) y CA3 (Cuerno de Amón 3). La zona más distal, designada CA1, se caracteriza por estar formada por células piramidales (Ver Figura 7) pequeñas, mientras la zona más proximal, formada por CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño. Las distintas áreas del hipocampo están estratificadas. Así, en la capa más interna encontramos un estrato rico en fibras, el alveus o sustancia blanca, luego, se encuentra una capa estrecha, el stratum oriens, formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales, que conforman el stratum pyramidale, de naturaleza glutamatérgica. A continuación, aparece el stratum radiatum, formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales. En la parte más exterior (cercana a la fisura hipocámpica) se encuentra el stratum lacunosum moleculare, que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Únicamente en el área CA3, entre los stratum pyramidale y radiatum, es posible encontrar un estrecho estrato acelular, formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3 y en el cuál se establecen conexiones con las fibras musgosas procedentes del giro dentado, el stratum lucidum (Domínguez, 2010).

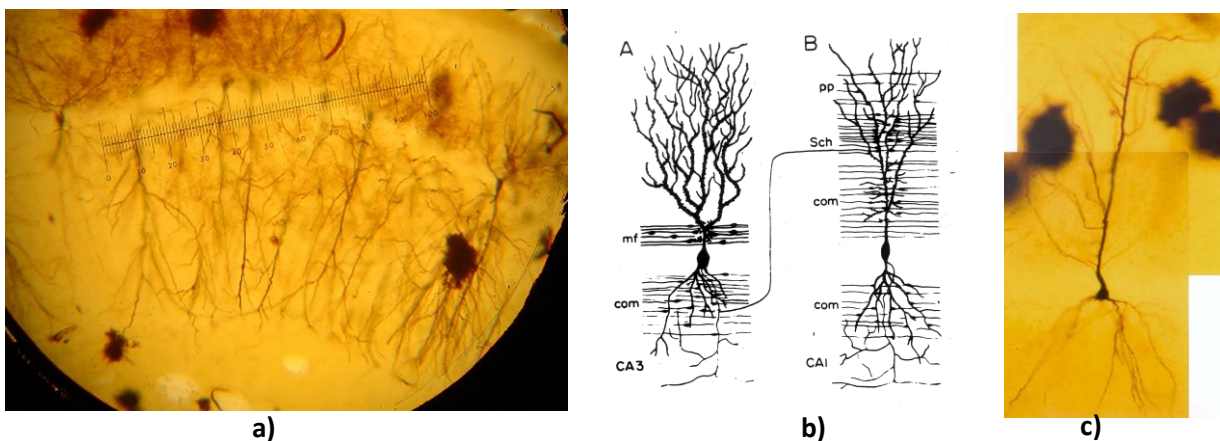


Figura 7. Neuronas piramidales del hipocampo. Impregnación rápida de Golgi (a y c), esquema de la conexión entre neuronas desde CA3 a CA1 (b). mf, fibras musgosas; com, comisurales; Sch, Schafer; pp, patrón perforante (Fotografías tomadas por Garín-Aguilar).

La corteza entorrinal se encuentra dividida en seis capas corticales bien definidas, las capas II y III están densamente pobladas por pequeñas células que envían sus axones hacia el hipocampo. Las capas V y VI están formadas por neuronas grandes que envían sus proyecciones fuera de la formación hipocámpica (Domínguez, 2010).

II.4.5. Circuito trisináptico hipocámpico

El concepto de circuito hipocámpico se basa en el estudio neurobiológico denominado vía trisináptica. La vía de la corteza entorrinal por medio de la vía del patrón perforante (primera sinapsis de la vía trisináptica), por excitación de las células granulares, las cuales dirigen sus axones (fibras musgosas) hacia las dendritas apicales de las células piramidales de CA3 en el striatum lucidum. Las fibras musgosas excitan potencialmente a las células piramidales de CA3 (segunda sinapsis de la vía trisináptica) las cuales proyectan sus axones (colaterales de Schaffer) hacia las neuronas de la región CA1 (tercera sinapsis). En el prototipo del circuito trisináptico, las células piramidales de CA1 constituyen la principal área eferente del hipocampo (Buzsáki & Eidelberg, 1982) Ver Figura 8.

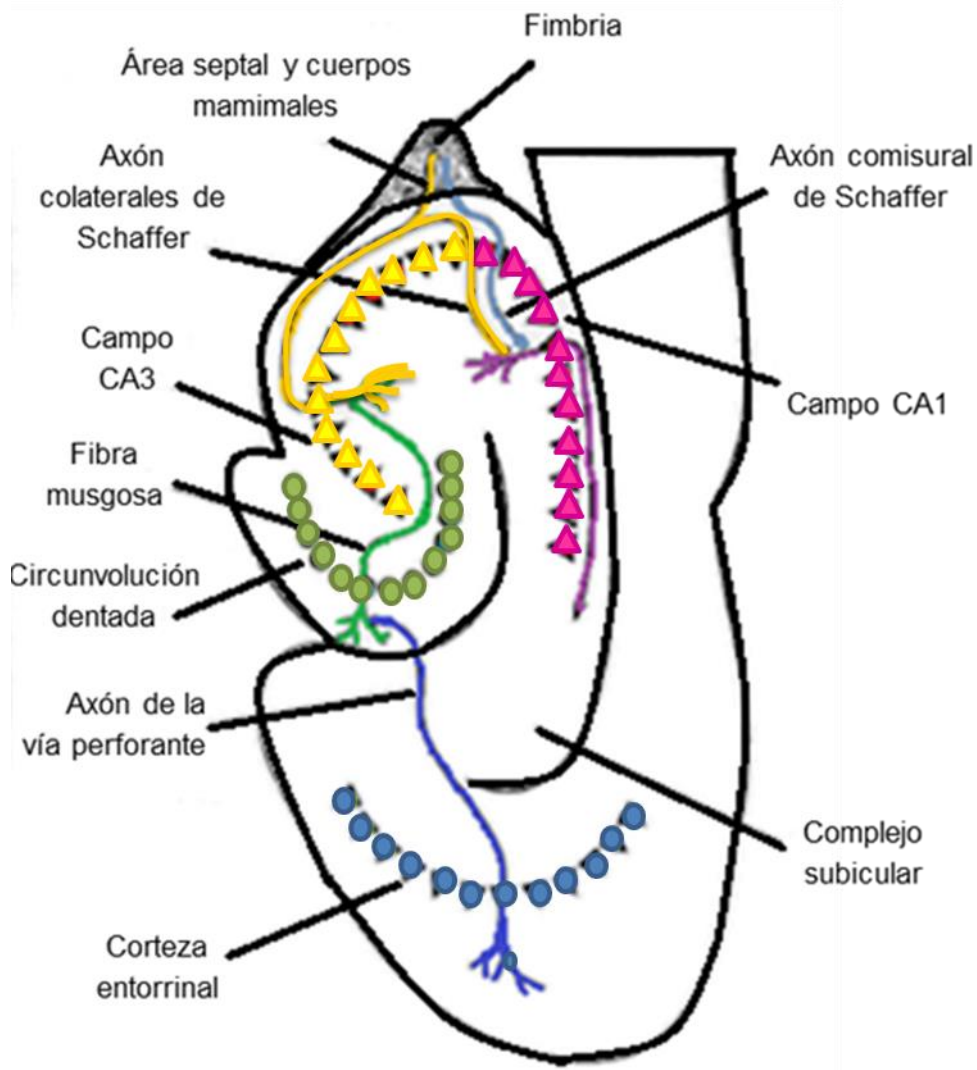


Figura 8. Esquema de la formación hipocámpica en donde se pueden apreciar las variaciones celulares (piramidal ▲ y granular ●), así como sus diferentes áreas anatómicas. Se observa el inicio del circuito trisináptico que parte de la vía de la corteza entorrinal por medio de la vía del patrón perforante (primera sinapsis), posteriormente las células granulares dirigen sus axones (fibras musgosas) hacia las dendritas apicales de las células piramidales de CA3 en el striatum lucidum, ulteriormente las fibras musgosas excitan potencialmente a las células piramidales de CA3 (segunda sinapsis de la vía trisináptica) las cuales proyectan sus axones (colaterales de Schaffer) hacia las neuronas de la región CA1 (tercera sinapsis) (Modificado de Carlson, 2005).

II.4.6. Neurotransmisores en el hipocampo

Los neurotransmisores son biomoléculas que transmiten información entre neuronas de manera consecutiva, mediante una sinapsis; interactúan con

receptores específicos produciendo una determinada respuesta fisiológica que puede provocar diversas reacciones como la excitación o inhibición entre otros (Dávila, 2013).

Entre los neurotransmisores que participan en la formación hipocámpica están los siguientes:

II.4.6.1 Glutamato.- Los agonistas de los receptores del grupo I facilitan la inducción de la potenciación de largo plazo (LTP) en la región CA1 de hipocampo y en la amígdala a través de la activación del receptor metabotrópico de glutamato 5 (mGluR5), mGluR1, por su parte, se ha relacionado con la depresión de largo plazo (LTD) que tiene lugar en las sinapsis entre las fibras paralelas y las células de Purkinje del cerebelo. La presencia del receptor metabotrópico de glutamato 8 (mGluR8) ha sido descrita en hipocampo (vía perforante lateral). En hipocampo se ha encontrado una expresión elevada del receptor metabotrópico de glutamato 4a (mGluR4a) en la capa molecular del giro dentado, en el estrato molecular de CA1 y en el estrato oriens (Millán, 2003).

II.4.6.2. Ácido- γ -aminobutírico (GABA).- Con sus distintas subunidades receptoras funciona como neurotransmisor inhibitor en el hipocampo en las actividades de memoria (Castro *et al.*, 2007). El neurotransmisor GABA es el que está más involucrado en la ansiedad y en las acciones de los tratamientos ansiolíticos (Rodríguez-Landa & Contreras, 1998).

II.4.6.3. Serotonina.- Existe una densa inervación serotoninérgica originada en el núcleo del rafe medial hacia el hipocampo así como una gran densidad de receptores, particularmente en la región del giro dentado. Los principales aferentes serotoninérgicos que arriban al hipocampo lo hacen a través de la fimbria-fornix y el haz del cíngulo (Gutiérrez *et al.*, 2008). La serotonina trabaja en conjunto con otros neurotransmisores como la dopamina y la noradrenalina, que están relacionados con la angustia, ansiedad, miedo, agresividad, así como los trastornos alimenticios. De igual manera, una de las funciones importantes de este neurotransmisor es actuar como reloj interno por medio del cual determina los ciclos de sueño y vigilia (Dávila, 2013).

II.4.6.4. Dopamina: La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad así como en la comunicación neuroendócrina (Bahena-Trujillo *et al.*, 2000).

II.4.6.5. Noradrenalina: la noradrenalina es generada en el *Locus coeruleus* (LC) que es el núcleo del encéfalo, en el tallo cerebral, las neuronas del LC envían sus axones principalmente a las estructuras límbicas, que incluyen a la amígdala, la formación hipocámpica y la corteza prefrontal. La actividad de las neuronas del LC aumenta significativamente en la vigilia y en episodios de estrés, en los cuales su actividad neuronal alcanza niveles de intensidad máxima, y de ese modo contribuye a alertar el organismo lo necesario para sobrevivir (Guadarrama *et al.*, 2006).

II.4.6.6. Acetilcolina.- La acetilcolina regula la capacidad para retener una información, almacenarla y recuperarla en el momento necesario. Los niveles altos de ACh potencian la memoria, la concentración y la capacidad de aprendizaje (Dávila, 2013). En un estudio reciente realizado por Almaguer y colaboradores (2014) se observó que la estimulación eléctrica de la amígdala induce un incremento en la liberación de acetilcolina en el giro dentado del hipocampo, lo cual sugiere que este neurotransmisor pudiera ser clave en la consolidación de la LTP en el hipocampo.

En la Figura 9 se pueden apreciar las principales conexiones subcorticales de los neurotransmisores mencionados anteriormente que participan en la FH.

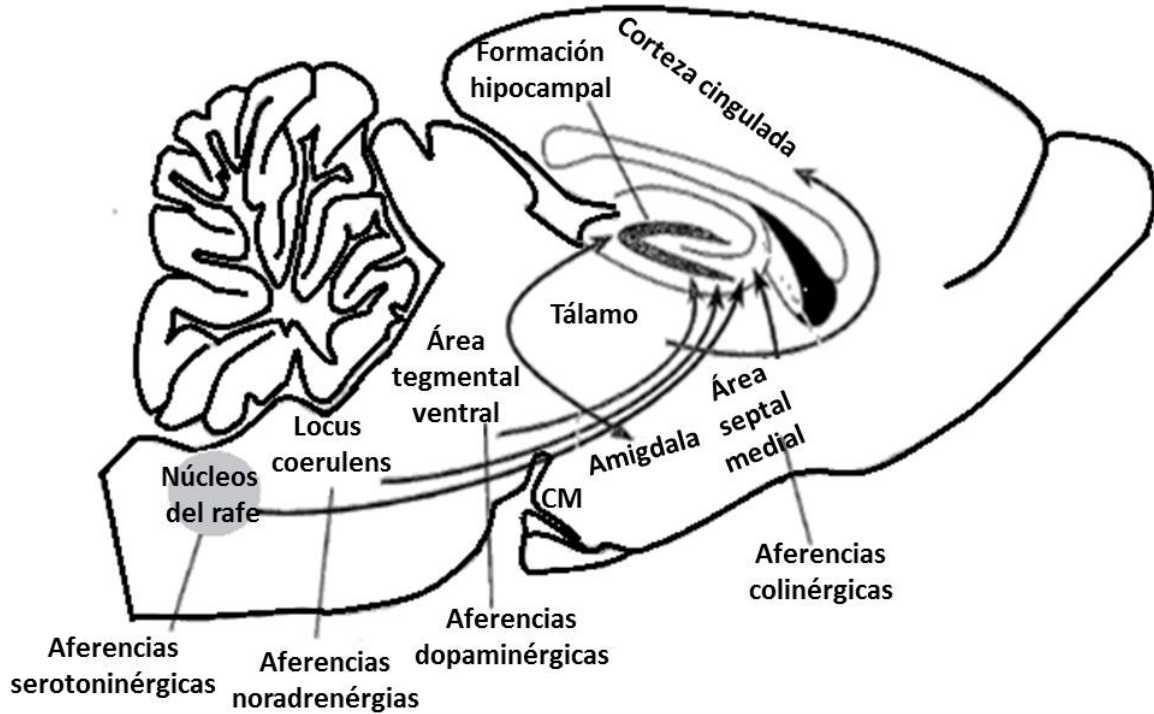


Figura 9. Vista sagital medial del encéfalo de ratona, en la que se presentan las principales conexiones subcorticales de la formación hipocámpica. CM: cuerpos mamilares (Tomado de Carlson, 2005).

II.4.7. Acetilcolina (ACh) y sus receptores

A pesar de que Langley y Dale habían postulado ya el concepto de neurotransmisor químico a principios del siglo XX, fue Otto Loewi quien en 1921 demostró, mediante un sencillo experimento, la existencia de un mediador químico al estimular la inervación autonómica del corazón de una rana. Esta sustancia fue caracterizada químicamente en 1929 y se le denominó acetilcolina, pues su estructura química resulta ser de gran simplicidad, un éter del ácido acético y la colina (Flores & Segura, 2005) Ver Figura 10.

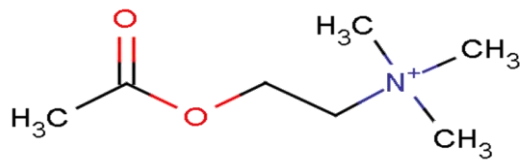


Figura 10. Estructura química de la Acetilcolina

El neurotransmisor acetilcolina (ACh) ejerce sus efectos sobre el SNC y el SNP a través de dos tipos distintos de receptores de ACh: los receptores muscarínicos y los receptores nicotínicos (mAChRs y nAChR, respectivamente). Los cinco subtipos de mAChR M1-M5 pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G y median en las respuestas metabólicas lentas a la ACh a través de acoplamiento de cascadas de segundos mensajeros, mientras que los nAChR son los canales iónicos activados por ligando que median la transmisión sináptica rápida del neurotransmisor. Los nAChR están involucrados en una amplia gama de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Los nAChR de tipo muscular se localizan postsinápticamente en la unión neuromuscular, donde es un mediador clave de la transmisión eléctrica para crear el tono del músculo esquelético, y por lo tanto, es el objetivo de varios relajantes musculares utilizado clínicamente. Los numerosos subtipos de nAChR neuronales se encuentran en los ganglios autónomos presináptica y postsinápticamente y en las neuronas colinérgicas en todo el SNC, en el que están involucrados en una serie de procesos conectados a las funciones cognitivas como: aprendizaje y memoria, excitación, recompensa, control motor, y la analgesia (Jensen *et al.*, 2005).

II.4.8. Receptores acetil colinérgico nicotínicos (nAChR)

Los receptores acetil colinérgico nicotínicos (nAChR) representan una gran familia de canales catiónicos con diversas estructuras y propiedades, que se componen de dos subunidades α y tres no α , comúnmente llamadas β (Vázquez-Palacios & Bonilla-Jaime, 2004).

La distribución de los receptores nicotínicos en el cerebro de roedores ha sido bien conocida por algunos años sobre la base de los datos obtenidos a partir de estudios de unión usando fármacos radiactivos nicotínicos, en hibridación *in situ* e inmuno-histoquímica (Gotti & Clementi, 2004).

Los niveles de expresión de las subunidades de nAChR en el SNC son significativamente inferiores a los de mAChRs. Dentro de las subunidades de

nAChR encontramos a; $\alpha 3$ y $\beta 4$ que son las subunidades prevalentes en la periferia mientras que las subunidades predominantes en el SNC son $\alpha 4$, $\beta 2$, y $\alpha 7$. La subunidad $\beta 2$ se expresa en casi todas las regiones del SNC, donde su distribución se traslapa con al menos una subunidad α (2 - 4, 6), de esta manera, la mayoría de los nAChR en el SNC (aproximadamente 90%) son $\alpha 4\beta 2$. Aunque también se expresa abundantemente $\alpha 4$, se distribuye menos ampliamente en el SNC que $\beta 2$, con el que $\alpha 4$ se colocaliza en la mayoría de las regiones (Wada *et al.*, 1989; Sargent, 2000; Picciotto *et al.*, 2001). Las concentraciones más altas de las dos subunidades se encuentran en el hipocampo, tálamo, y la corteza. La subunidad $\alpha 7$ también se expresa en la mayoría de las regiones del cerebro con niveles de expresión más altos en la corteza y el hipocampo, mientras que la subunidad está ausente o se expresa en niveles bajos en las regiones talámicas y en el ganglio basal (Sher *et al.*, 2004; Sargent, 2000; Picciotto *et al.*, 2001).

La distribución de las otras subunidades de nAChR en el SNC es mucho más limitada. Además de su amplia expresión en el SNP, $\alpha 3$ y $\beta 4$ están localizados en el SNC en regiones tales como la habénula media, la habénula dorsal, el núcleo interpeduncular, y el locus coeruleus. Sus niveles de expresión son significativamente más bajos en las regiones corticales y el hipocampo, y las dos subunidades están prácticamente ausentes en partes del cerebro medio (Sher *et al.*, 2004; Sargent, 2000; Picciotto *et al.*, 2001). La expresión del nAChR $\alpha 2$ no se ha estudiado a gran detalle, pero esta subunidad parece que se expresa en muy pocas regiones del cerebro con la más alta expresión en el núcleo interpeduncular, donde se cree que forma al nAChR $\alpha 2\beta 4$. La distribución de las subunidades $\alpha 6$ y $\beta 3$ en el SNC es también muy limitada, las dos subunidades están altamente colocalizadas y se encuentran en niveles elevados en las regiones catecolaminérgicas, tales como en la sustancia nigra, el área tegmental ventral, el locus coeruleus, el núcleo interpeduncular, y la habénula medial. La subunidad $\alpha 5$ también se encuentra en relativamente pocas regiones del SNC, mostrando sus niveles de expresión más altos en la sustancia nigra, el área ventral tegmental, la habénula medial, y algunas regiones corticales (Jensen *et al.*, 2005).

En diferentes especies se han observado diferencias en cuanto al patrón de distribución de las subunidades de nAChR en el cerebro de roedor y de mamíferos, por lo tanto, el siguiente mapa (Figura 11) sólo debe ser visto como una representación cruda de la expresión de las subunidades de nAChR (Jensen *et al.*, 2005).

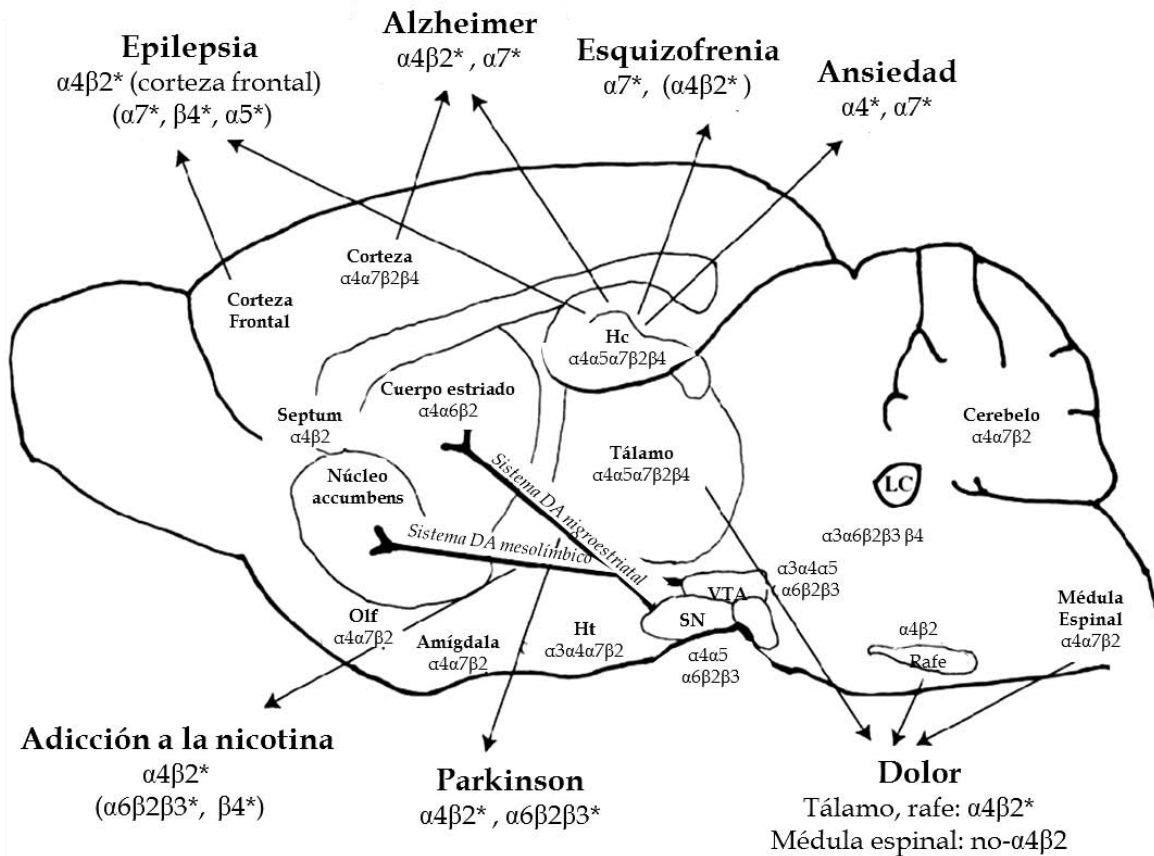


Figura 11. Esquema de la distribución de los nAChR en el cerebro de rata. Hc: hipocampo; Ht: hipotálamo; VTA: área tegmental ventral; SN: sustancia nigra; Olf: región olfatoria; Am: amígdala; LC: locus coeruleus (Tomado de Jensen *et al.*, 2005).

III. ANTECEDENTES

III.1. Memoria

La mayoría de datos acerca de alteraciones de memoria tras lesiones temporales mediales derivan del estudio de pacientes sometidos a cirugía cerebral para el alivio de una epilepsia que no respondía al tratamiento farmacológico. El caso más famoso es el del paciente H.M. (Scoville & Milner, 1957), a quien se le extirparon bilateralmente las estructuras temporales mediales (hipocampo, corteza entorrinal, circunvolución parahipocámpica y partes de la corteza temporal). H.M. siguió manteniendo la inteligencia y la memoria inmediata normales, aunque era prácticamente incapaz de aprender nada nuevo. Su rendimiento permanecía relativamente intacto en pruebas de memoria implícita. Podía adquirir nuevas destrezas y respondía al condicionamiento clásico. Recordaba su infancia y el pasado remoto, aunque se veía muy limitado en el recuerdo de los 10 años previos a la operación. Las lesiones provocadas al paciente H.M. incluían la amígdala, el hipocampo y la región parahipocámpica.

III.2. Hipocampo y memoria

Los diversos estudios de daño en el HC de primates han sugerido que éste participa en la asociación de la información proveniente de diferentes regiones corticales (Maguire *et al.*, 1996; Rolls, 1996). En la rata, se ha demostrado que el HC participa en la memoria espacial y juega un papel esencial en los procesos de integración (Sharp, 1997; McNaughton *et al.*, 1996) y consolidación del aprendizaje (Morris *et al.*, 1982; Olton, 1983; Olton & Papas, 1979; Vann *et al.*, 2000). Se sabe también que participa en conductas de exploración y rastreo olfatorio (Swanson, 1983).

El HC es considerado como la estructura esencial involucrada en diversos procesos de memoria. Por ello, los estudios con animales tienden a evaluar tareas de aprendizaje y de memoria que dependen específicamente de esta estructura (Izquierdo & Medina, 1997). Los trabajos experimentales con animales muestran

que un daño en el área hipocámpica produce un deterioro en la memoria similar al que ocurre con la pérdida de memoria episódica en pacientes humanos (Eichenbaum, 1992). Los estudios neuroanatómicos y de fisiología celular en monos han ayudado a determinar que las áreas de asociación del lóbulo temporal interno, como la FH, reciben información de casi todas las áreas restantes de asociación. Estas conexiones permiten que el HC recoja todo el flujo de actividad cognitiva progresiva, y por lo tanto relacione diferentes aspectos de un único suceso de forma que pueda ser recordado como una experiencia coherente (Kandel, 2001).

El HC se subdivide en hipocampo dorsal (HD) y en hipocampo ventral (HV), no sólo morfológicamente, sino también en su conectividad por ejemplo, algunas diferencias funcionales; atribuyendo al HD una mayor participación en el procesamiento de la memoria espacial, aunque hay estudios indicando la participación hipocámpica en memorias no espaciales como por ejemplo, conductas motivadas aversivamente como la respuesta de evitación inhibitoria en roedores (Ambrogio-Lorenzini *et al.*, 1997). Ambrogio-Lorenzini y colaboradores (1996) demostraron la implicación del HD en la adquisición, consolidación y recuperación de la memoria aplicando en esta estructura, tetrodotoxina (TTX) (10 ng en 1.0 µL de salina) (bloqueador de la transmisión sináptica en los canales de sodio dependientes de voltaje). Así mismo Ambrogio-Lorenzini y colaboradores (1997) encontraron que el efecto de la inactivación del HV antes de la recuperación de la información fue debido por un efecto amnésico más marcado que la inactivación del HD con TTX. Por lo tanto, HV parece desempeñar un papel más importante en la recuperación de la información que HD. De hecho, la integridad funcional de HV parece ser crítica para una duración mucho más corta que la del HD, siendo necesario sólo durante los periodos más tempranos de consolidación (esto observado cuando la administración de TTX en HV 1.5 h después de la prueba de adquisición, no tuvo ningún efecto adverso en la memorización de respuesta de evitación pasiva, mientras que el bloqueo del HD sí fue seguido por amnesia). Por lo tanto, todos estos hallazgos pueden tomarse

como una indicación de independencia funcional relativa de HD e HV, al menos en relación con la evitación inhibitoria condicionada.

Por otro lado Levin y colaboradores (2002) encontraron que la infusión aguda tanto de DH β E como de Metilcaconitina (MLA) en HV causó un deterioro significativo de la memoria de trabajo en el laberinto radial de ocho brazos, sin embargo estos antagonistas respondieron de diferente manera a la nicotina sistémica (5 mg/kg/día). El déficit de memoria inducido por DH β E fue eliminado por la administración sistémica crónica de nicotina, mientras que el déficit inducido por MLA no lo fue.

Existe suficiente evidencia experimental para demostrar que el HV está involucrado en la memorización de una respuesta de evitación pasiva, dado que el déficit de dicha memorización ha sido reportado después de lesiones irreversibles en HV, sin embargo, estos informes no proporcionan suficiente información de cuándo, es decir, durante cuál de las fases del proceso mnemónico participa el HV selectivamente: adquisición, consolidación o recuperación del engrama de respuesta de evitación pasiva (Ambrogui-Lorenzini *et al.*, 1997).

Por otro lado cabe mencionar, que de algún interés es el análisis de las analogías funcionales, si las hay, de la estructura neural actualmente investigada y de otras, como la amígdala, la cual se sabe que está íntimamente conectada con el HC, y que participa en los procesos de memorización de respuesta de evitación pasiva de rata. Dichas conexiones amígdala-hipocampo parecen ir casi exclusivamente al HV (Ambrogui-Lorenzini *et al.*, 1997) y dado que se encuentra particularmente involucrado con memorización aversiva podremos utilizarle como el lugar de administración de nuestro fármaco.

III.3. Acetilcolina y memoria

En 1976 se hizo pública la primera anomalía bioquímica clara asociada con la enfermedad de Alzheimer (EA). Encontrándose en hipocampo y en la corteza cerebral de los enfermos, que la enzima colina acetiltransferasa (CAT) presentaba niveles hasta 90% inferiores a lo normal. Esta enzima cataliza la síntesis de ACh a

partir de sus precursores colina y acetilcoenzima A (Flores & Segura, 2005). Abundantes datos sugieren que las terminales colinérgicas del HC son de importancia crítica para la formación de la memoria, por lo tanto, es plausible emitir la hipótesis de que algunos de los defectos cognitivos de la EA son resultado directo de la reducción de la neurotransmisión dependiente de la ACh en esta estructura (Reiner & Fibiger, 2000).

Por otro lado los niveles de ACh en el núcleo accumbens y en la corteza insular aumentan durante un condicionamiento de aversión gustativa (Mark *et al.*, 1995). También hay un aumento en la liberación de ACh en la neocorteza mientras las ratas realizan una tarea atencional (Sarter & Bruno, 1997) y ante la novedad (Miranda *et al.*, 2000). Por otra parte la administración de drogas colinérgicas como la oxotremorina o la fisostigmina, facilita la retención de un aprendizaje de evitación pasiva en ratones (Baratti *et al.*, 1979). Otros estudios revelan que la administración antes del entrenamiento de antagonistas de los receptores colinérgicos (atropina y escopolamina) deteriora el desempeño de las ratas en varias tareas de aprendizaje (Buresova *et al.*, 1964; Carlton, 1963; Herz, 1960). Otro trabajo muestra que la administración preentrenamiento de un inhibidor reversible de la acetil colín esterasa (AChE) como la fisostigmina, aumenta el desempeño de los animales (Cardo, 1959). La conclusión más importante de estos estudios es que una disminución del sistema colinérgico produce un deterioro en el desempeño, mientras que un aumento del mismo sistema produce una facilitación del aprendizaje (Power *et al.*, 2003).

III.4. nAChR y memoria

En el SNC los nAChR regulan procesos tales como excitabilidad celular, integración neuronal y la liberación de transmisor, estos neurotransmisores participan en procesos que son cruciales para las operaciones neuronales que influyen en funciones fisiológicas como el sueño, la fatiga, la ansiedad, el dolor (Vincler *et al.*, 2006), la locomoción (Le Novere *et al.*, 1999) la ingesta de

alimentos (Inglis *et al.*, 1994), así como también en diversas funciones cognitivas (Gotti & Clementi, 2004).

Basándose en sus diferencias filogenéticas, farmacológicas y propiedades funcionales, la familia heterogénea de subtipos de nAChR se ha dividido en dos principales clases: los receptores con capacidad de unión α -bungarotoxina (α Bgtx) nAChRs homoméricos formados por subunidades homopentaméricas de $\alpha 7$ - $\alpha 9$ o heteroméricos (compuesto por las subunidades heteropentaméricas $\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$, $\alpha 10$), y los nAChR, que contienen las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y las subunidades $\beta 2$ - $\beta 4$, formando receptores heteroméricos que se unen con alta afinidad a agonistas (Gotti & Clementi, 2004) Ver Figura 12.

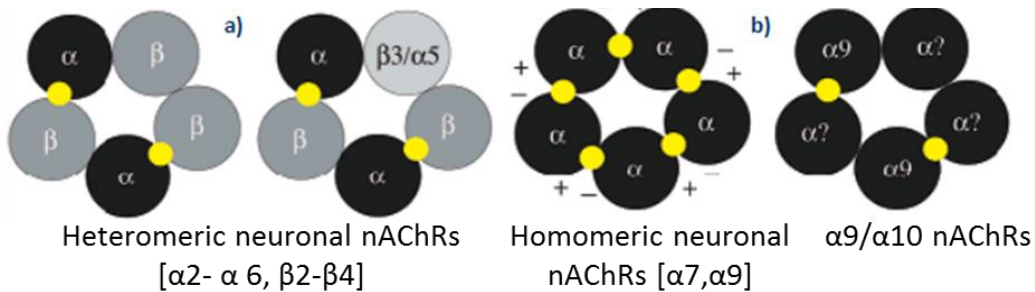


Figura 12. Tipos de receptores colinérgicos neuronales. (a) heteroméricos y (b) homoméricos (Tomado de Jensen *et al.*, 2005).

Los estudios de microscopía electrónica llevados a cabo en membranas postsinápticas del órgano eléctrico de *Torpedo californica* han constituido una fuente de información clave para el conocimiento de la estructura de los receptores nicotínicos.

Los receptores nicotínicos son estructuras proteicas que están formadas por cinco subunidades transmembrana dispuestas alrededor de un poro acuoso central (McGehee & Role, 1995; Jones *et al.*, 1999; Karlin, 2002). Cada subunidad está compuesta por un extremo N-terminal extracelular, glicosilado, de aproximadamente unos 200 aminoácidos, tres segmentos transmembrana, un bucle citoplasmático y un cuarto segmento transmembrana con un extremo C-terminal extracelular. Además todas las subunidades contienen un lazo Cys en el extremo N-terminal compuesto por dos residuos de cisteína separados por trece

aminoácidos y unidos por un puente disulfuro (Hogg *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2009) (Ver Figura 13).

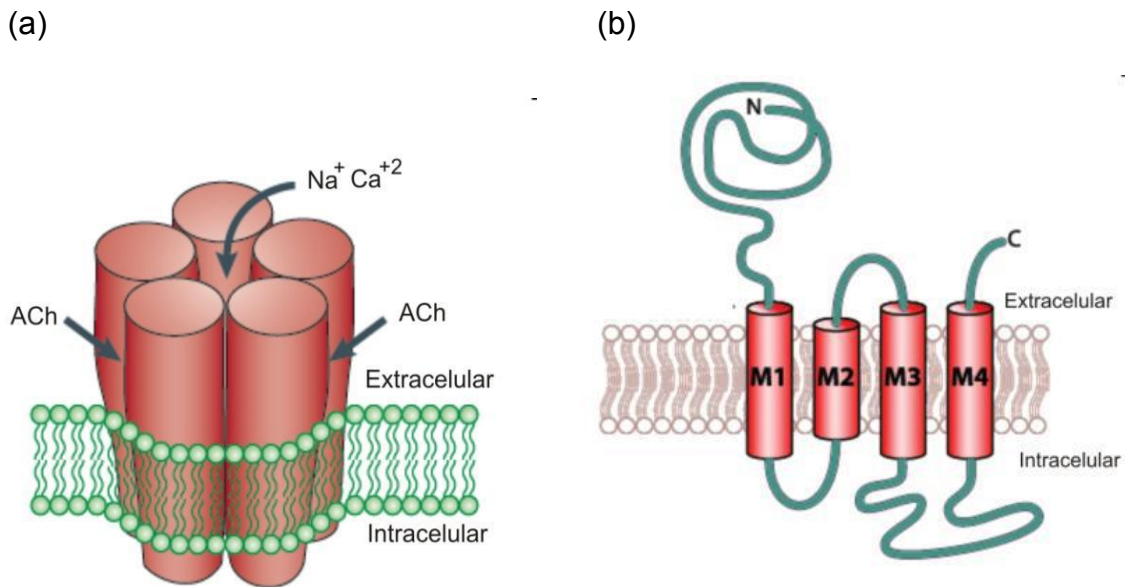


Figura 13. Estructura del receptor nicotínico. (a) Los receptores nicotínicos se disponen formando un poro central que permite la entrada de iones (Adaptado de Karlin, 2002). (b) Cada subunidad está compuesta por cuatro segmentos transmembrana, un extremo amino terminal, un bucle citoplasmático y un extremo C-terminal extracelular.

Los cuatro segmentos transmembrana (SM) son α -hélices que se disponen simétricamente rodeando el poro hidrófilo. Los SM2 de las diferentes subunidades se sitúan en el interior, dando lugar a un anillo interno que da forma y constituye la compuerta del poro, mientras que los SM1, 3 y 4 se localizan en el exterior y separan el anillo interno de la membrana lipídica (Miyazawa *et al.*, 2003; Unwin, 2005).

Las subunidades α , contienen en el extremo N-terminal, cerca del SM1 dos residuos de cisteína contiguos, en la posición 191-192, que son necesarios para la unión con el agonista. Las subunidades β carecen de ellos (Kao *et al.*, 1984; Karlin *et al.*, 1986; Sargent, 1993; Lukas *et al.*, 1999; Albuquerque *et al.*, 2009).

El sitio de unión del receptor heteromérico se sitúa entre una subunidad α y una β . Debido a que los receptores nicotínicos neuronales están constituidos por

dos subunidades α y tres β , éstos poseen dos sitios de unión para la ACh (Gotti & Clementi, 2004; Dani & Bertrand, 2007).

En el sitio de unión se pueden diferenciar dos zonas, una principal y una complementaria. En los receptores heteroméricos la zona principal se encuentra en las subunidades α ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$) y la zona complementaria se localiza en las subunidades $\beta 2$ o $\beta 4$. Las subunidades $\alpha 5$ y $\beta 3$ no contribuyen a ninguno de los dos componentes del sitio de unión (Changeux & Edelstein, 1998; Corringer *et al.*, 2000).

El sitio de unión del agonista al receptor se encuentra en el extremo N-terminal de la subunidad α , cerca de los dos residuos de cisteína contiguos. En el proceso de unión participan residuos de aminoácidos específicos (Tyr 93, Trp 149, Tyr 190 y Tyr 198) (Karlin, 2002; Celie *et al.*, 2005). Estos aminoácidos se encuentran en los bucles A - C de la zona principal y son capaces de interactuar con el ligando. La zona complementaria contiene los bucles D - F (Ver Figura 14 y 15).

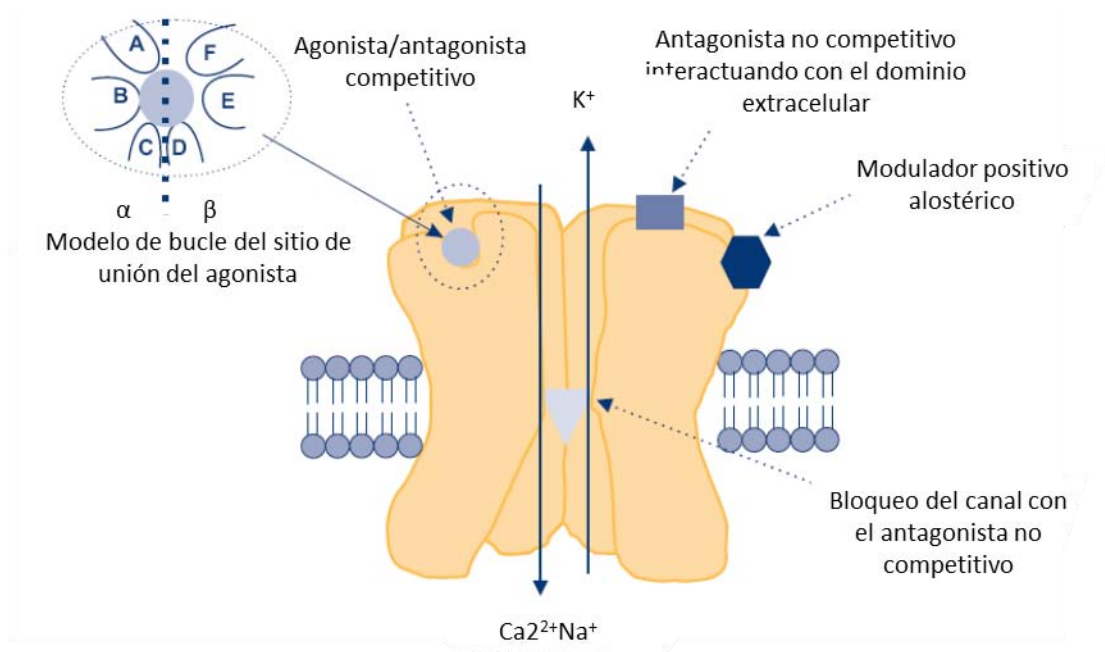


Figura 14. Estructura del receptor nicotínico y lugares de unión de los agonistas y antagonistas (Tomado de Del Barrio, 2010).

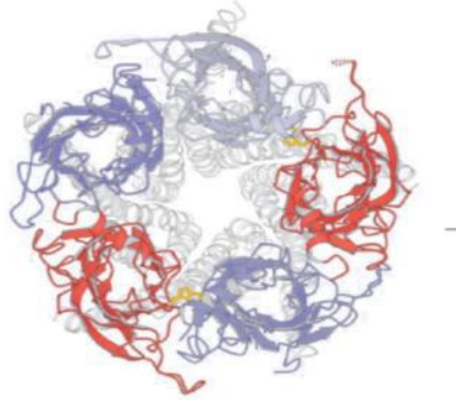


Figura 15. Estructura del receptor nicotínico desde la hendidura sináptica. Subunidades α de color rojo, subunidades β de color violeta, sitio de unión al agonista de color amarillo (Adaptado de Unwin, 2005).

Han sido encontrados agonistas nicotínicos tanto para receptores $\alpha 7$ y $\alpha 4\beta 2$ que mejoran la función de memoria. Sin embargo, esto no significa que los otros subtipos de receptores nicotínicos no estén involucrados también. La falta de ligandos verdaderamente selectivos a nAChR capaces de penetrar la barrera hematoencefálica (BBB) ha complicado las investigaciones de los papeles fisiológicos de los subtipos de nAChR específicos del SNC (Jensen *et al.*, 2005). Por lo tanto, el desarrollo de agonistas y antagonistas nicotínicos diferencialmente selectivos podrían proporcionar información más completa sobre la participación de la diversidad tan amplia de los subtipos de receptores nicotínicos sobre la memoria (Levin *et al.*, 2002).

III.5. Trastornos del sistema nervioso y nAChR

Las diferentes combinaciones de las subunidades que forman a los receptores nicotínicos neuronales tienen diferentes propiedades y pueden presentar una distribución regional, celular y subcelular distinta, y estar implicados en diferentes procesos; fisiológicos como: el dolor (Vincler *et al.*, 2006), la locomoción (Decker *et al.*, 1995; Le Novere *et al.*, 1999) y la ingesta de alimentos (Inglis *et al.*, 1994); cognitivos como: la atención (Sarter & Bruno, 1997), el aprendizaje (Baratti *et al.*, 1979; Buresova *et al.*, 1964; Carlton, 1963; Herz, 1960) y la memoria (Almaguer *et al.*, 2014) así como también en neuropatologías como:

la enfermedad de Alzheimer (López-Valdés & García-Colunga, 2003), la enfermedad de Parkinson (Quik & Kulak, 2002; Champtiaux *et al.*, 2003), disfunciones cerebrales como el síndrome de Tourette (Gotti & Clementi, 2004), el autismo (Lee *et al.*, 2002; Granon *et al.*, 2003; Martín-Ruiz *et al.*, 2004), epilepsias como la hereditaria de tipo ADNFL (Epilepsia frontal nocturna autosómica dominante) (Combi *et al.*, 2004) o la esquizofrenia (Court *et al.*, 2000), e incluso en procesos de ansiedad y depresión (Picciotto *et al.*, 2002; Shytle *et al.*, 2002) o analgesia (Vincler, 2005). La participación de la ACh en multitud de funciones fisiológicas, ha propiciado la aparición de una farmacología muy extensa, destinada a bloquear o incrementar la actividad colinérgica; sin embargo, existen pocos fármacos con acción selectiva para los sistemas colinérgicos cerebrales (Flores & Segura, 2005). Es así como sustancias que interactúan con estos receptores acetilcolinérgico nicotínicos (agonistas o antagonistas) han despertado gran interés debido a su posibilidad de interferir en diversos procesos mentales (López-Valdés & García-Colunga, 2003).

La mayoría de los agonistas nicotínicos disponibles actualmente (Ver Cuadro 1) se caracterizan por no poseer selectividad al receptor, es decir, son capaces de activar varios de los subtipos de receptores nicotínicos. La aparición de nuevos compuestos selectivos permite conocer la implicación de un determinado subtipo de receptor en una determinada función fisiológica o fisiopatológica (Escalona, 2009).

La mayoría de los antagonistas de los nAChR se han obtenido a partir de fuentes naturales (Jensen *et al.*, 2005). Algunos de los antagonistas que se han empleado para determinar el papel de los diversos receptores nicotínicos aparecen también en el Cuadro 1. Los antagonistas competitivos, interaccionan cerca o en el sitio de unión del agonista, estabilizando al receptor en una conformación cerrada y previniendo la unión del agonista. La inhibición con antagonistas reversibles, puede ser contrarrestada a altas concentraciones de agonista, por eso la concentración adecuada para la utilización de un antagonista debe ser valorada según la concentración de agonista utilizada

Efecto del antagonista nicotínico erisodina sobre la consolidación de la memoria

Desafortunadamente, hay un número limitado de antagonistas selectivos para cada subtipo de receptor (Del Barrio, 2010).

AGONISTA	RECEPTOR	TIPO	REFERENCIA
Acetilcolina	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$	Neurotransmisor	Olivos, 2007
Epibatidina	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$	Alcaloide	Flores & Segura, 2005
Anabaseína	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$	Alcaloide	De Fiebre <i>et al.</i> , 1995; Kem <i>et al.</i> , 2004
Oxotremorina-M (Oxo-M)	$\alpha 9\alpha 10$	Sintetizado	Olivos, 2007
Nicotina	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 9$, $\alpha 10$	Alcaloide	Olivos, 2007
GTS-21	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$	Sintetizado	De Fiebre <i>et al.</i> , 1995
Colina	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 3\beta 4$	lipotrópico	Olivos, 2007
PNU-282987	$\alpha 7$	Sintetizado	Tatsumi <i>et al.</i> , 2005
TC-5619	$\alpha 7$	Sintetizado	Pedersen & Cohen, 1990
Vareniclina	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 7$	(-)-citisina	Mihalak <i>et al.</i> , 2006
ANTAGONISTA	RECEPTOR	TIPO	REFERENCIA
α -conotoxina MII	$\alpha 6\beta 2$, $\alpha 6\beta 2\beta 3$, $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$, $\alpha 4\alpha 6\beta 2$	Alcaloide	Crooks <i>et al.</i> , 2014
α -conotoxina ImII	$\alpha 7$	Alcaloide	Ellison <i>et al.</i> , 2003
α -conotoxina RglA	$\alpha 9$, $\alpha 10$	Alcaloide	Ellison <i>et al.</i> , 2006
Dihidro- β -eritroidina (DH β E)	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7$	Sintetizado	Dwoskin & Crooks, 2001; Williams & Robinson, 1984; Sharples & Wonnacott, 2001
Erisodina	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 7$	Alcaloide	Decker <i>et al.</i> , 1995
Mecamilamina	$\alpha \beta$, $\alpha 7$	Sintetizado	Shytle <i>et al.</i> , 2002
α -bungarotoxina (BGT)	$\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$, $\alpha 10$	Alcaloide	Flores <i>et al.</i> 1992; Hill <i>et al.</i> 1993; Wada <i>et al.</i> 1989; Zoli <i>et al.</i> , 1995
Metilcaconitina (MLA)	$\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\alpha 6\beta 2$	Alcaloide	Dwoskin <i>et al.</i> , 2008

Cuadro 1. Exposición de algunos de los agonistas y antagonistas de los receptores nicotínicos cerebrales, receptores a los que presentan afinidad, tipo de sustancia a la que pertenecer y referencias..

Como se mencionó anteriormente los nAChR conformados por subunidades $\alpha 4\beta 2$ son cerca del 90% de los nAChR cerebrales totales y representan los sitios de unión con mayor afinidad a la nicotina (Vázquez-Palacios & Bonilla-Jaime, 2004) y hasta el momento, la fisiología y participación del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ en los procesos mnemónicos, se ha venido determinando utilizando el antagonista competitivo dihidro β -eritroidina (DH β E), derivado de los antagonistas colinérgicos α y β -eritroidina, los cuales son alcaloides aislados de especies del género *Erythrina* perteneciente a la familia Fabaceae (Leguminosae) (Ibarra, 2010) Ver Anexo 1, sin embargo DH β E ha mostrado afinidad a otros receptores neuronales heteroméricos que contienen a las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ (Dwoskin & Crooks, 2001; Williams & Robinson, 1984), presentado especificidad sobre receptores $\alpha 3\beta 2$ y afinidad más baja al receptor $\alpha 7$ (Sharples & Wonnacott, 2001). Erisodina, alcaloide extraído de la misma planta ha mostrado ser siete veces más selectivo a los receptores $\alpha 4\beta 2$ que su análogo DH β E (Decker *et al.*, 1995). Aunado a esto, recientes estudios llevados a cabo en el laboratorio han demostrado que tanto la administración de Erisodina en HD (1, 2 μ g/lado) (López, 2007) como en HV (1, 2 μ g/lado) (Gerzon, 2010), deterioran significativamente la retención de la memoria en una prueba de cámara de evitación inhibitoria.

IV. JUSTIFICACIÓN

Por tanto es necesaria una investigación que permita comprender la manera en que los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del HV, participan en los procesos de consolidación de la memoria. Y dado que erisodina presenta alta afinidad a estos receptores, podremos utilizarle como herramienta para evidenciar la participación de este receptor en la consolidación de la memoria.

V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que existe un gran número de informes que demuestran que la administración sistémica de drogas anticolinérgicas interfieren con la formación de la memoria (Quirarte & Prado-Alcalá, 2004) se hace necesario una investigación que nos ayude a comprender la manera en que los receptores nicotínicos del HV participan en los procesos mnemónicos, específicamente en este estudio, en la consolidación de la memoria.

VI. HIPÓTESIS

Dado que Erisodina presenta alta afinidad a los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$, impedirá la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

VII. OBJETIVO

VII.1. Objetivo general

Evaluar el efecto que tiene el bloqueo de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral, en la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

VIII.1. Material Vegetal

Los ejemplares de *Erythrina americana* Mill. fueron colectados en los jardines de la FES-Iztacala y determinados taxonómicamente en el Herbario MEXU del Instituto de Biología por el Dr. Mario Sousa Sánchez.

VIII.2. Extracción de alcaloides

El extracto metanólico fue obtenido sometiendo las semillas de *E. americana* a extracción en equipo de Soxhlet. Después por extracción ácido-base de la fracción se obtuvo la fracción de alcaloides libres en metanol.

VIII.3. Aislamiento y purificación

El alcaloide Erisodina usado en este estudio ya había sido previamente aislado y purificado en el laboratorio. Brevemente, el extracto alcaloideo metanólico se pasó a través de cromatografía en columna (CC) (gel de sílica G60 Merk 70-230 mallas), las fracciones fueron monitoreadas por cromatografía en capa fina (CCF). El compuesto aislado se llevó al Laboratorio de Bioconversiones de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología del IPN para su análisis espectroscópico. El espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H ($^1\text{HRMN}$) que aparece en el Anexo 4 reveló la estructura del alcaloide Erisodina.

VIII.4. Animales

Se utilizaron 46 ratas adulto macho de la especie *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar (250-300g), las cuales fueron proporcionadas por el Bioterio del Instituto de Neurobiología, Juriquilla, Querétaro para trasladarse al bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Los animales fueron mantenidos en cajas individuales con un periodo de luz-oscuridad de 12 horas y libre acceso a comida y agua. Todos los experimentos se llevaron a cabo entre las 11:00 y las 16:00 horas.

VIII.5. Cirugía

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (45 mg/Kg, i.p.), ya sedadas se les inyectaron 20 unidades de atropina, posteriormente con la ayuda de un aparato estereotáxico les fue implantado un par de cánulas de 10 mm de largo dirigidas al HV con las siguientes coordenadas a partir de Bregma: AP -5.1; ML \pm 4.8; D-V -7.4, utilizando el Atlas de Paxinos & Watson (2005). Toda la investigación se condujo observando las regulaciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio, NOM-062-ZOO-1999.

VIII.6. Manipulación

Después de la recuperación de la cirugía y previo a la sesión de entrenamiento, los animales fueron manipulados durante tres días consecutivos. La manipulación tuvo como finalidad que el animal se habituara al manejo del experimentador, y de esta manera evitar interferencias al momento de la evaluación conductual, misma que ocurrió al octavo día de la cirugía.

VIII.7. Aparato y Procedimiento

Durante el entrenamiento los animales fueron colocados dentro del compartimiento iluminado de la cámara de evitación inhibitoria, después de diez segundos la compuerta que divide los dos compartimientos se abrió y se permitió al animal el paso al compartimiento oscuro. Se registró la latencia de adquisición (tiempo en segundos que el animal tardó en pasar del compartimiento seguro al de castigo. Inmediatamente después de que el animal cruzó y colocó sus cuatro patas sobre el piso del compartimiento de castigo, se cerró la compuerta y ésta recibió un choque eléctrico inevitable en las patas (0.8 mA/5s). Después del suministro del choque, la compuerta que separa los compartimientos se reabrió y se registró la latencia de escape (tiempo en segundos que el animal tardó en regresar al compartimiento seguro de la cámara), 30 segundos después los animales fueron retirados de la cámara, y colocados en su caja y regresados al cuarto del bioterio. La consolidación de la memoria fue evaluada 24h después, procediendo de

manera semejante a la sesión de entrenamiento, sólo que en esta ocasión no se suministró el choque eléctrico y se registró la latencia de retención (tiempo en segundos que el animal tardó en pasar del compartimiento seguro al de castigo, haciendo un corte arbitrario a los 600 segundos). Un esquema de la cámara de evitación aparece en el Anexo 2.

VIII.8. Fármacos e infusión

Inmediatamente después de que los animales fueron entrenados, los tratamientos fueron inyectados bilateralmente, usando dos jeringas Hamilton de 10 μ L acopladas a una bomba de infusión continua (WPI modelo sp200i). Las jeringas estaban unidas, a través de un tubo de polietileno, a inyectores contruidos con aguja de acero inoxidable. En el momento de la infusión, los inyectores se introdujeron en las cánulas para administrar intra-hipocámpicamente a grupos independientes de ratas uno de los siguientes tratamientos: 0.9 μ g/ μ L de solución salina (SAL), 2.0 μ g/ μ L de nicotina (NIC2), 2.0 μ g/ μ L de DH β E (DH β E2), 2 μ g/ μ L de Erisodina (EDINA2) o 6.0 μ g/ μ L de Erisodina (EDINA6). En todos los casos la velocidad de infusión fue de 1 μ L/min.

VIII.9. Perfusión

Una vez terminada la fase conductual, todos los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico y perfundidos intracardialmente con solución salina isotónica seguida de formaldehído al 10%, utilizando una bomba de infusión (Modelo Manostat) con una velocidad de 48 RPM. Una vez terminada la perfusión, se obtuvieron los cerebros y se almacenaron en frascos viales con solución de formaldehído al 10%.

VIII.10. Histología

Para verificar el sitio a donde llegó la punta de los inyectores se realizó el estudio histológico. A los cerebros se les hicieron cortes coronales de 50 micras de espesor que se fijaron posteriormente en portaobjetos y fueron teñidos con la técnica de Nissl. El análisis microscópico permitió descartar del análisis estadístico aquellos animales cuyas puntas de inyector no se encontraron en la estructura (Anexo 3).

VIII.11. Análisis estadístico

El corte arbitrario que se hace a los 600 segundos durante la retención, hace necesaria la utilización de pruebas estadísticas no paramétricas, por lo que los datos de latencia de adquisición, escape y retención fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis y como prueba post hoc la de U-Mann Whitney ($p < 0.05$). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS versión 15.

IX. RESULTADOS

IX.1. *Erythrina americana*

Los ejemplares de *Erythrina americana* fueron identificados taxonómicamente en el Herbario MEXU del Instituto de Biología por el Dr. Mario Sousa Sánchez, quedando registrados con el Número 599011 (Ver Figura 16).



Figura 16. Ejemplar de *Erythrina americana*. Número de registro 599011.

IX.2. Espectro de Resonancia Magnética

Los espectros de $^1\text{HRMN}$ que se practicaron al compuesto puro Erisodina se presentan en el Anexo 4. Como se indicó estos espectros fueron generados previamente en el laboratorio de Farmacobiología de la FES-I en colaboración con el de Bioconversiones del IPN y se presentan en ese apartado para confirmar la identidad de Erisodina.

IX.3. Verificación de la ubicación de las cánulas

El análisis histológico permitió descartar las ratas cuyas cánulas no se encontraron en la estructura (HV). En la Figura 17 (a) se muestra la representación esquemática de un corte coronal en el eje A-P 5.1 de Bregma (Paxinos & Watson, 2005), también se muestra una micrografía en (b) de un

corte histológico señalando que las cánulas efectivamente se encontraron en el hipocampo ventral (HV).

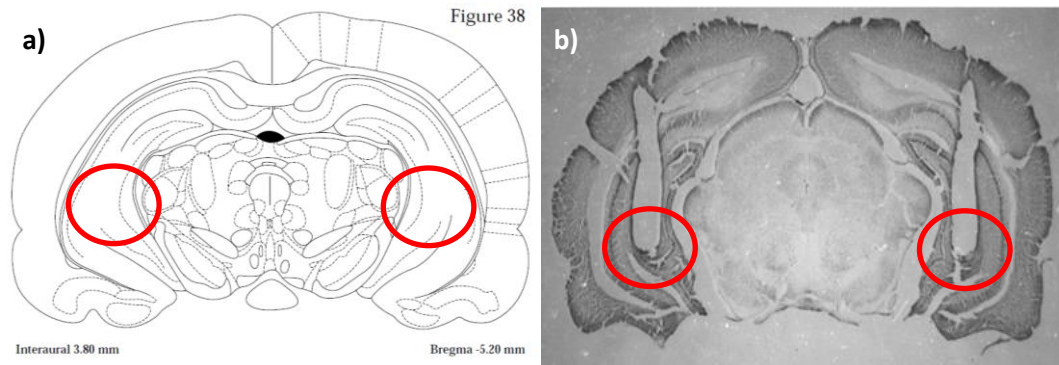


Figura 17. a) Representación esquemática de un corte coronal en el eje AP = -5.1, ML = \pm 4.8, DV = - 7.4 en relación a Bregma (Paxinos & Watson, 2005) b) Micrografía (tinción de Nissl) que muestra las puntas de las cánulas dirigidas al HV.

IX.4. Etapa de entrenamiento

En el Cuadro 2 se muestran las medianas de latencias de adquisición y escape obtenidas con los cinco tratamientos administrados a los grupos de ratas.

TRATAMIENTO	ADQUISICIÓN (s)	ESCAPE (s)
Salina 1μL/min (n=13)	24.890	1.280
Nicotina 2μg/μL (n=9)	27.420	1.400
DHβE 2μg/μL (n=9)	23.590	0.890
Erisodina 2μg/μL (n=6)	24.780	1.095
Erisodina 6μg/μL (n=9)	19.180	2.390

Cuadro 2. Mediana de las latencias de adquisición y escape obtenidas durante el entrenamiento de evitación inhibitoria con un choque eléctrico de 0.8 mA. Los tratamientos; SAL (1 μ L/min), NIC (2 μ g/ μ L), DH β E2 (2 μ g/ μ L), EDINA2 (2 μ g/ μ L) y EDINA6 (6 μ g/ μ L) fueron administrados inmediatamente después del entrenamiento (n= 46).

Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis indicaron que en la fase de entrenamiento, no se encontraron diferencias significativas en las latencias de entrada ($H(4) = 1.056, p = 0.901$), entre los grupos tratados con SAL, NIC2, DH β E2, EDINA2 o EDINA6 (Figura 18). Y tampoco se presentaron diferencias en las latencias de escape de estos grupos ($H(4) = 3.635, p = 0.458$) (Figura 19).

El hecho de no presentarse diferencias significativas entre las latencias de entrada de los grupos, indica que todos los animales reaccionaron de manera similar al exponerse por primera vez a la cámara de evitación. Y la ausencia de diferencias en las latencias de escape entre los grupos, sugiere que las ratas presentaron semejante capacidad de reacción ante el estímulo aversivo, choque eléctrico. Estos resultados son evidencia de la homogeneidad entre los grupos durante el entrenamiento de evitación; atributo indispensable cuando se realizan pruebas conductuales (Garín-Aguilar *et al.*, 2009).

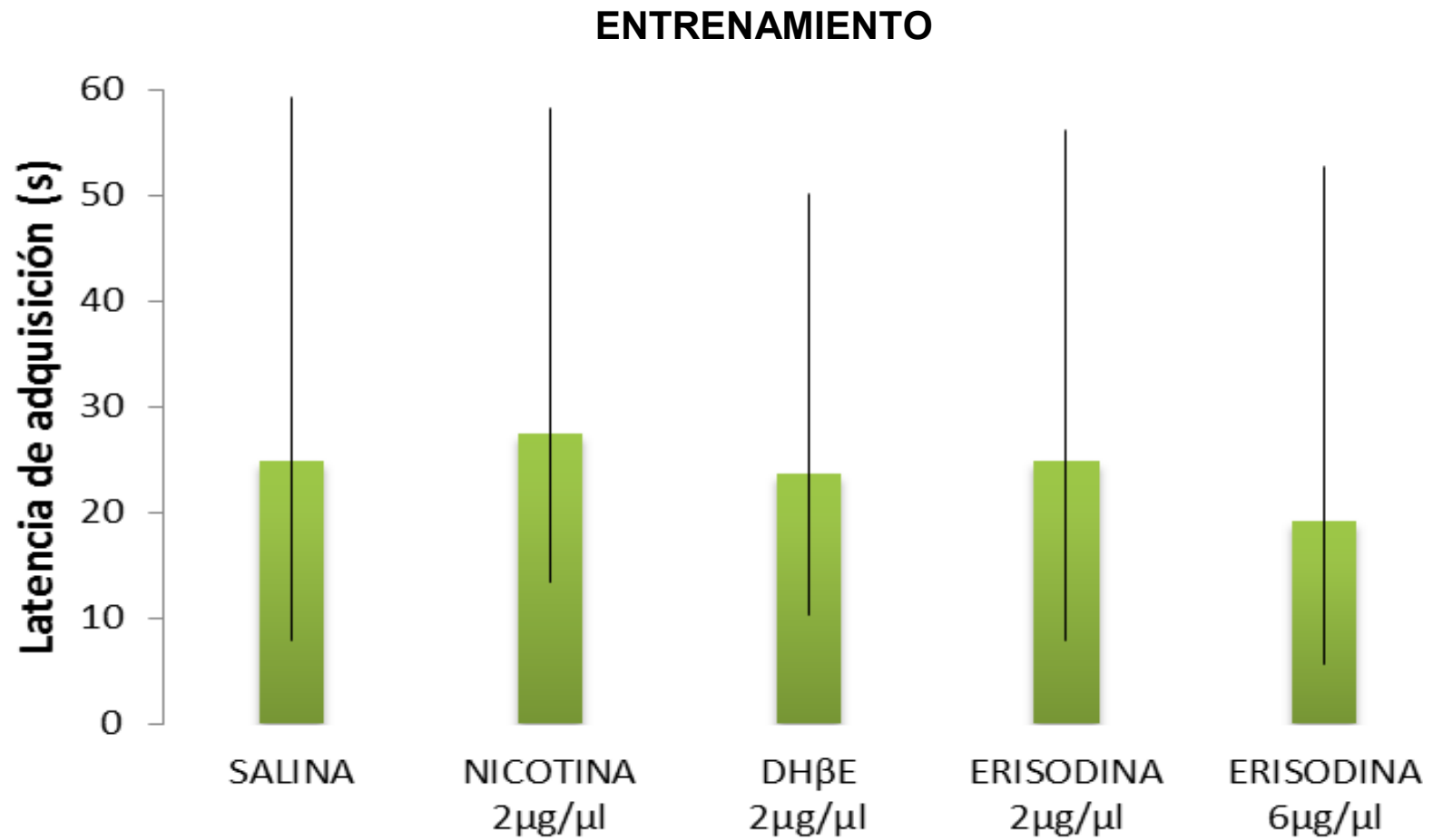


Figura 18. Mediana de los valores de latencia de adquisición (\pm rango intercuartil) de los grupos de ratas inyectadas inmediatamente después del entrenamiento. Las gráficas muestran latencias de entrenamiento o de entrada similares en los cinco grupos.

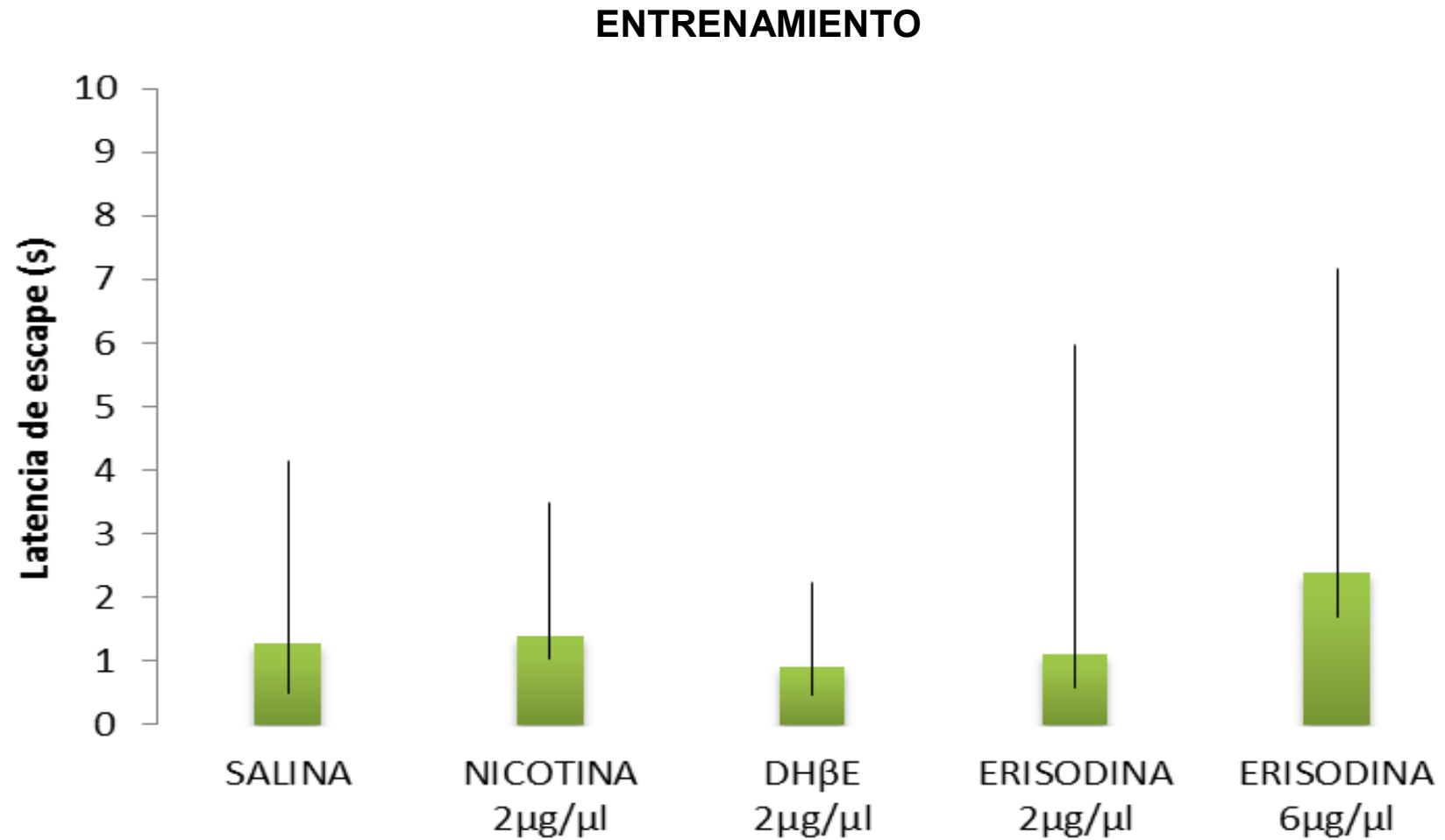


Figura 19. Mediana de los valores de latencia de escape (\pm rango intercuartilar) de los cinco grupos de ratas evaluados, los cuales presentaron latencias de escape similares.

IX.5. Etapa de prueba

En el Cuadro 3 y en la Figura 20 se muestran las medianas de las latencias de retención alcanzadas por cada grupo SAL, NIC2, DH β E2, EDINA2 ó EDINA6, mismas que fueron obtenidas en la sesión de prueba realizada 24 horas después de la administración hipocámpica (HV) de los tratamientos (justo después del entrenamiento); es decir, los animales para esta sesión no se encontraban ya bajo el efecto de los fármacos, pues estos se administraron justo después del entrenamiento. La prueba de Kruskal-Wallis indicó que se presentaron diferencias significativas en las latencias de retención de los grupos $H(4) = 29.53, p < 0.0001$. La prueba post-hoc U de Mann-Whitney indicó que no hubo diferencias significativas entre las latencias de retención de los grupos SAL y NIC2 ($p = 0.647$), lo cual nos indica que si bien el agonista colinérgico nicotina, no deterioró la consolidación de la memoria, tampoco tuvo un efecto de mejora en la retención de la tarea de evitación. Por otro lado, las latencias de retención de los antagonistas colinérgicos DH β E2, EDINA2 y EDINA6 fueron significativamente menores a las de los grupos control SAL y NIC2 ($p =$ entre 0.008 y 0.0001), lo que indica que los antagonistas deterioraron la retención de la tarea de evitación. Es importante hacer notar que el deterioro de la memoria fue mayor en el grupo que recibió DH β E2 con respecto a los grupos de EDINA2 y EDINA6 ($p = 0.005, p = 0.011$ respectivamente), mientras que no se presentaron diferencias entre las latencias de retención de los grupos tratados con el antagonista EDINA2 y EDINA6 ($p = 0.776$).

TRATAMIENTO	RETENCIÓN (s)
<i>Salina 1μL/min (n=13)</i>	379.910
<i>Nicotina 2μg/μL (n=9)</i>	355.440
<i>DHβE 2μg/μL (n=9)</i>	18.200 * ♦
<i>Erisodina 2μg/μL (n=6)</i>	118.095 *
<i>Erisodina 6μg/μL (n=9)</i>	79.140 *

Cuadro 3. Mediana de las latencias de retención obtenidas durante la etapa de prueba de evitación inhibitoria. La prueba de U Mann Whitney fue aplicada entre los grupos; SAL (1μL/min) y NIC (2μg/μL) y DHβE2 (2μg/μL), EDINA2 (2μg/μL) y EDINA6 (6μg/μL). El * indica diferencias significativas con respecto a los controles SAL y NIC2, el ♦ indica diferencias significativas entre los antagonistas ($p \leq 0.05$) (n = 46).

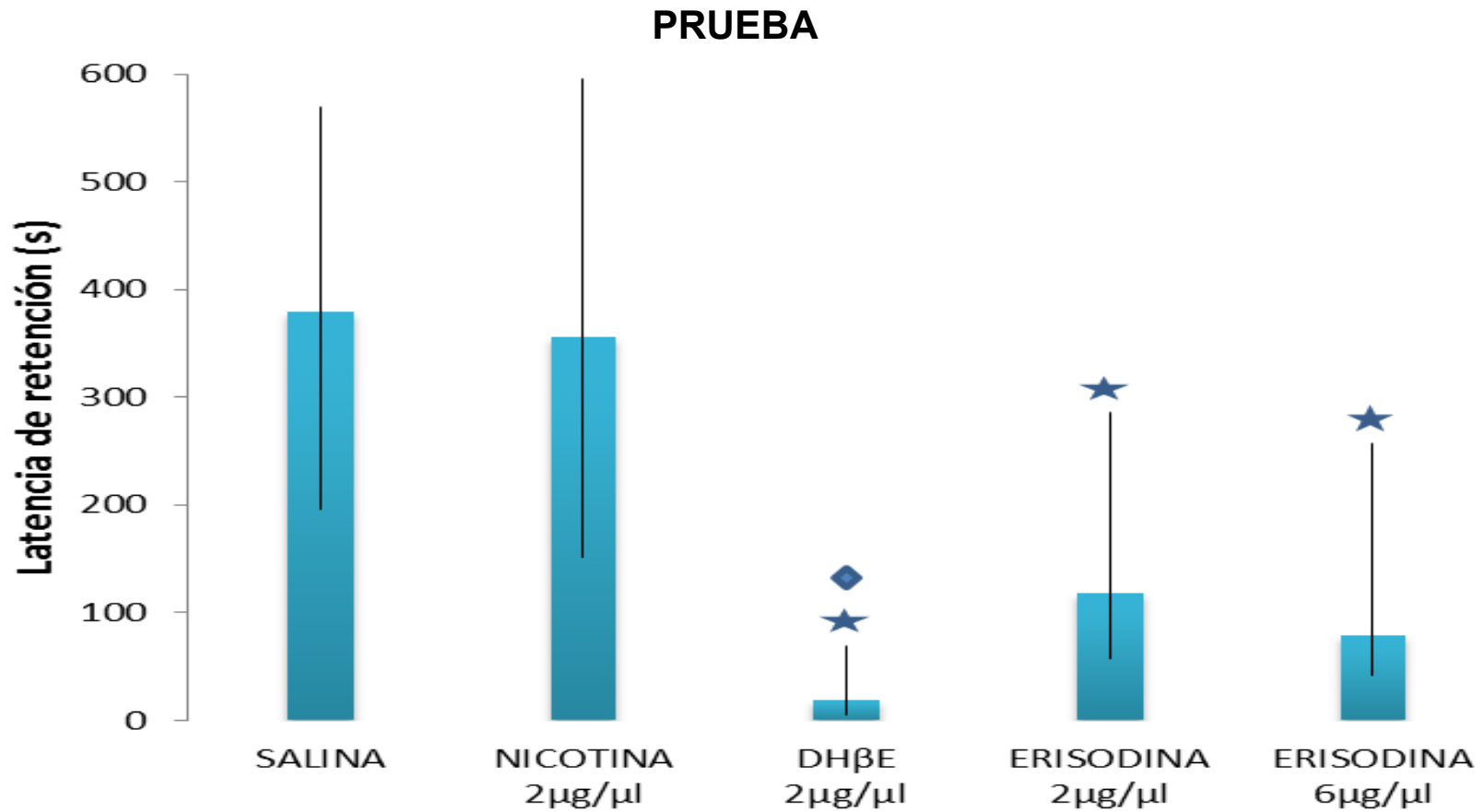


Figura 20. Mediana de los valores de latencia de retención (\pm rango intercuartilar) de los cinco grupos de ratas. Encontrando que DH β E 2.0µg/µL produjo el mayor deterioro en comparación con Erisodina 2.0, 6.0µg/µL. Los grupos salina y nicotina no afectaron la retención de la tarea *p<0.05.

X. DISCUSIÓN

Este estudio tuvo la finalidad de evaluar el efecto del bloqueo de receptores nicotínicos neuronales en la consolidación de la memoria usando el paradigma de evitación inhibitoria. El bloqueo de receptores nicotínicos se hizo administrando Erisodina (alcaloide aislado de semillas del género *Erythrina*), considerando que este antagonista presenta siete veces más afinidad al receptor $\alpha 4\beta 2$ que el antagonista DH β E (Decker *et al.*, 1995), que ha mostrado afinidad a otros receptores neuronales heteroméricos que contienen a las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ (Dwoskin & Crooks, 2001; Williams & Robinson, 1984), presentado especificidad sobre receptores $\alpha 3\beta 2$ y afinidad más baja al receptor $\alpha 7$ (Sharples & Wonnacott, 2001).

Los resultados conductuales evidenciaron que los animales no mostraron diferencias significativas durante la entrada al compartimiento oscuro de la cámara, esto era de esperarse dado que previamente a la sesión de entrenamiento los sujetos experimentales fueron cuidadosamente manipulados, además de que no se encontraban bajo el efecto de ningún fármaco cuando ocurrió esta etapa de entrenamiento. Tampoco se presentaron diferencias significativas durante el escape. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por Ambrogio-Lorenzini y colaboradores (1996 y 1997) quienes no encontraron diferencias significativas en las latencias de entrada y de escape al evaluar las implicaciones funcionales de HD e HV en la memoria de la respuesta de evitación inhibitoria en ratas.

En la etapa de retención, la cual se llevó a cabo 24 h después de la sesión de entrenamiento, se observó que las ratas tratadas con el agonista colinérgico NIC (2 μ g/ μ L) y las del grupo control tratadas con SAL (1 μ L/min) mostraron las latencias de retención más altas, es decir, estos grupos evitaron pasar al compartimiento oscuro de la cámara. Este comportamiento de las ratas puede ser interpretado como el mantenimiento de la memoria del evento

aversivo (choque eléctrico 0.8 mA) que recibieron durante el entrenamiento. Estos resultados son consistentes con los obtenidos en un experimento previo donde ni SAL ni NIC (1 μ g/ μ L) administradas en el HD impidieron la consolidación de la memoria (Garín-Aguilar *et al.*, 2009).

Es importante hacer notar que si bien en el presente estudio NIC (2 μ g/ μ L) no impidió la consolidación de la memoria, tampoco indujo una mejora. Levin y colaboradores (1993a) reportaron que el tratamiento crónico de nicotina (12mg/Kg/día) mejoró significativamente el rendimiento de la memoria de trabajo de ratas en el laberinto radial de brazos, efecto que además fue observado 2 semanas después de retirar la administración de nicotina. Por otro lado Levin y colaboradores (1993b) también reportaron que la administración crónica de nicotina es útil para contrarrestar los déficits de la memoria de trabajo en ratas con lesiones cerebrales y de ratas sin lesiones utilizando el paradigma de laberinto radial. En un estudio de doble ciego, McClernon y colaboradores (2003) observaron que NIC disminuyó los errores en la memoria de trabajo tanto de sujetos fumadores (14 ó 21 mg) como de no fumadores (7 mg) como reflejo de la mejora en la atención. Barros y colaboradores (2004) también encontraron que nicotina (3 μ g/ μ L) aplicada en HD mejoró la consolidación de evitación inhibitoria en ratas. Con base en estos antecedentes, la ausencia de diferencias estadísticas entre los grupos SAL y NIC observadas en este trabajo, puede deberse a que se requiera administrar una dosis más alta (superior a 2 μ g/ μ L), dado que en los protocolos experimentales anteriormente mencionados las dosis administradas fueron superiores y crónicas.

Por lo que respecta a los antagonistas, en la sesión de prueba, un deterioro de la consolidación de la memoria fue observado a las 24 horas de haber inyectado bilateralmente en HV los antagonistas DH β E2, EDINA2 y EDINA6, estos resultados evidencian la implicación de esta estructura (HV) y específicamente de los receptores nicotínicos en la consolidación de la memoria. Los hallazgos de este estudio son consistentes con lo reportado por Ambrogi-Lorenzini y colaboradores (1997) quienes inactivando de manera temporal con TTX (10 ng/mL) la región ventral del hipocampo encontraron que

dicha región es crucial durante la adquisición, consolidación y recuperación de la respuesta de evitación pasiva.

DH β E es un antagonista del receptor α 4 β 2 que ha permitido determinar la participación de dicho receptor en las diversas etapas de la formación de la memoria. Nuestros resultados indican que la dosis de DH β E administrada en el HV (2 μ g/ μ L) deterioró la consolidación de la tarea aversiva y son consistentes con lo reportado por Barros y colaboradores (2004) quienes evidenciaron que DH β E deterioró la adquisición, la consolidación y la evocación de memoria de corto y largo plazo de una tarea de evitación inhibitoria administrando este antagonista en diferentes dosis (2, 6 y 18 μ g/lado) en la región CA1 del HD aplicando un choque eléctrico de 0.5 mA. También en un estudio previo realizado en el laboratorio (Garín-Aguilar *et al.*, 2009) se reportó que aplicando DH β E (2 μ g/ μ L) en HD se deterioró la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria (retención de 180.6 s) y los resultados del presente estudio muestran que la dosis de 2 μ g/ μ L de DH β E en el HV causó un deterioro mayor en la consolidación de la memoria de evitación inhibitoria (retención de 18.2 s).

Resulta interesante la observación de que al administrar la misma dosis de DH β E en el HV el valor de latencia de retención se vea disminuido con respecto a la latencia de retención obtenida con el bloqueo del HD, lo que aparentemente reflejaría un mayor deterioro de la memoria en HV con respecto al HD. Sin embargo, sería necesario evaluar en un nuevo experimento el efecto de diferentes dosis del antagonista administradas en una y otra estructura (HD e HV) para identificar qué región del HC es más sensible a la aplicación de DH β E durante la consolidación de la tarea y así delimitar la participación de los receptores nicotínicos en cada una de estas estructuras.

En este estudio también quedó evidenciado que el deterioro en la consolidación fue significativamente mayor con el antagonista DH β E (2 μ g/ μ L) que con el alcaloide Erisodina (2 y 6 μ g/ μ L) y no se encontraron diferencias entre las dosis de Erisodina. Sin embargo, a pesar de que no se presentaron diferencias significativas entre las latencias de retención (118.095 s y 79.140 s) con la administración de 2 μ g/ μ L y 6 μ g/ μ L de Erisodina en HV, se observó que los valores de retención tienden a disminuir al incrementar la concentración de

Erisodina. Sería conveniente proponer un estudio donde se evalúe si el efecto del deterioro es dependiente de la concentración de Erisodina.

Cabe mencionar que por medio de un modelo de expresión heteróloga de receptores en ovocitos de *Xenopus*, se ha demostrado que los ovocitos que contienen receptores $\alpha 4\beta 2$ son más sensibles a DH β E que los ovocitos que expresan receptores $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ ó $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ (Luetje & Patrick, 1991; Harvey & Luetje, 1996). Y recientemente, se evaluó el efecto que tienen los alcaloides Erisopina, Erisodina y DH β E sobre la corriente inducida por acetilcolina en ovocitos que expresaron los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ (Robles, 2014). La autora probó dos concentraciones de acetilcolina (500 nM y 50 μ M). Los registros mostraron que la inhibición de los 3 alcaloides disminuyó al aumentar la concentración de acetilcolina; lo que indicó que están compitiendo por el mismo sitio de unión a acetilcolina. Así los autores sugirieron que estos alcaloides son antagonistas competitivos de receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$, cuya afinidad fue la siguiente: afinidad de Erisopina > afinidad de Erisodina > afinidad de DH β E. Considerando lo anterior y lo señalado por Decker y colaboradores (1995) que Erisodina es 7 veces más afín a los receptores $\alpha 4\beta 2$, en nuestro estudio se esperaba que el deterioro en la retención fuese mayor cuando los receptores $\alpha 4\beta 2$ del HV se bloqueaban con Erisodina que cuando se bloqueaban con DH β E. Sin embargo, los resultados en este estudio mostraron contundentemente, el deterioro de la consolidación con el antagonista DH β E. Una posible explicación a estos resultados es que el bloqueo de los otros receptores a los que DH β E también ha mostrado afinidad: $\alpha 3\beta 2$ (Decker *et al.*, 1995), $\alpha 3\beta 4$ (Chávez-Noriega *et al.*, 1997) y $\alpha 7$ (Sharples & Wonnacott, 2001) está ocasionando un deterioro adicional sobre la consolidación de la memoria, es decir; es probable que esos otros receptores que son bloqueados por DH β E también jueguen un papel en el proceso de consolidación de la memoria. Sin embargo, esta hipótesis debe someterse a prueba experimental.

En conjunto, los resultados del presente estudio indican que el bloqueo de los receptores nicotínicos neuronales del HV con el antagonista Erisodina, impide la consolidación de la memoria. Estos datos están en concordancia con estudios que destacan la participación del HV en la memoria de evitación

inhibitoria (Ambrogio-Lorenzini *et al.*, 1997). También se ha propuesto que el HC ventral juega un papel prevaeciente en conductas motivadas aversivamente (por ejemplo evitación inhibitoria, condicionamiento de conducta de congelamiento y ansiedad) debido a sus densas conexiones anatómicas con estructuras subcorticales (hipotálamo, amígdala y núcleo accumbens) implicadas en la defensa y emoción (Bast *et al.*, 2001; Moser & Moser, 1998; Petrovich *et al.*, 2001), mientras que al HD se le atribuye un papel principal en el procesamiento de memoria espacial (Eichenbaum, 1996; Moser *et al.*, 1993). Los resultados de este estudio también son consistentes con lo reportado por Martínez *et al.* (2002) quienes reportaron que después de una lesión neurotóxica producida con ácido kaínico en el campo CA3 del HV, se produjo deterioro en la retención de la tarea de evitación inhibitoria. Finalmente, los resultados de este estudio evidenciaron la participación de los recetores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral en la consolidación de la memoria de la tarea de evitación inhibitoria.

XI. CONCLUSIONES

- La aplicación de Erisodina en HV permitió evaluar la participación diferencial del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ sobre la consolidación de la memoria.
- El deterioro en la consolidación fue significativamente mayor con DH β E, lo que sugiere que el bloqueo de los otros receptores a los que DH β E es afín, ocasiona un deterioro adicional sobre la retención.
- Estos resultados indican que los receptores nicotínicos localizados en el hipocampo ventral participan en la regulación de la consolidación de la memoria.

XII. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO

- Es importante continuar explorando el efecto de Erisodina sobre otros subtipos de receptores nicotínicos, para determinar si este alcaloide es subtipo-selectivo.
- Es necesario evaluar el efecto de diferentes concentraciones del antagonista Erisodina administradas en HD e HV para constatar qué región del HC es más sensible a la aplicación de DH β E durante la consolidación de la tarea y así delimitar la participación de los receptores nicotínicos en cada una de estas estructuras.
- Es conveniente evaluar si el efecto de deterioro de la memoria de la tarea aversiva es dependiente de la concentración de Erisodina.
- Es importante el desarrollo de nuevos agonistas y antagonistas naturales o sintéticos que permitan establecer con mayor precisión el papel funcional de los receptores nicotínicos neuronales y/o desarrollar sustancias de interés clínico.
- Un estudio adicional puede diseñarse para evaluar el efecto que diferentes intensidades de choque eléctrico tienen en la consolidación de la memoria de una tarea de evitación inhibitoria entrenada bajo el bloqueo de receptores nicotínicos neuronales.

XIII. REFERENCIAS

- Aguado-Aguilar, I. (2001). Aprendizaje y memoria. *Revista de Neurología*, 32(4), 373-381.
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M. & Rogers, S. W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiological Reviews*, 89(1), 73-120.
- Almaguer, M. W., Bergado, R. J. & Cruz, A. R. (2014). Plasticidad sináptica duradera (LTP): un punto de partida para entender los procesos de aprendizaje y memoria. Disponible en: <http://www.rcim.sld.cu/revista7/articulohtm/plasticidad.htm>.
- Amaral, D. G. & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571-591.
- Ambrogio-Lorenzini, C. A., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B. & Tassoni, G. (1996). Role of dorsal hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response: A tetrodotoxin functional inactivation study. *Brain Research*, 730(1-2), 32-39.
- Ambrogio-Lorenzini, C. G., Baldi, E., Bucherelli, C., Sacchetti, B. & Tassoni, G. (1997). Role of ventral hippocampus in acquisition, consolidation and retrieval of rat's passive avoidance response memory trace. *Brain Research*, 768(1-2), 242-248.
- Atkinson, R. C. & Shiffrin, R. M. (1968). Human memory: A proposed system and its control processes. En Craik I. M. F. & Lockart R. S. (1980). Niveles de procesamiento: Un marco para la investigación sobre la memoria. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, 11(1), 671-684.
- Baddeley, A. D. (1995). The psychology of memory. En: Gramunt F. N. (2008). Normalización y validación de un test de memoria en envejecimiento

normal, deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer. Tesis doctoral, Universidad Ramon Llul. Barcelona, España.

- Bahena-Trujillo, R., González, F. & Arias-Montaño, J. (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Revista Biomédica*, 11(1), 39-60.
- Baratti, C. M., Huygens, P., Mino, J., Merlo, A. & Gardella, J. (1979). Memory facilitation with posttrial injection of oxotremorine and physostigmine in mice. *Psychopharmacology*, 64(1), 85-88.
- Barros, D. M., Ramírez, M. R., Reis, E. A., e Izquierdo, I. (2004). Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. *Neuroscience*, 126(1), 651-656.
- Bast, T., Zhang, W. N. & Feldon, J. (2001). The ventral hippocampus and fear conditioning in rats - Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA (A) agonist muscimol. *Experimental Brain Research*, 139(1), 39-52.
- Bear, M. F., Connors, B. W. & Paradiso, M. A. (2002). Neurociencia explorando el cerebro. Barcelona: Masson.
- Bower, G. H. & Hilgard, E. R. (2011). Teorías de Aprendizaje. México: Trillas.
- Buresova, O., Bures, J., Bohdanecky, Z. & Weiss, T. (1964). Effect of atropine on learning, extinction, retention and retrieval in rats. *Psychopharmacology*, 5(1), 255-263.
- Buzsáki, G. & Eidelberg, E. (1982). Convergence of associational and commissural pathways on CA1 pyramidal cells of the rat hippocampus. *Brain Research*, 237(2), 283-295.
- Cardo, B. (1959). Action de l'amphetamine dextrogyre et de l' eserine sur un conditionnement de fuite et sur les phénomènes de discrimination. *Journal of Physiology*, 51(1), 845-860.
- Carlson, N. R. (2005). Fisiología de la conducta (8ª Ed.). Madrid: Pearson Educación S. A.
- Carlton, P. L. (1963). Cholinergic mechanisms in the control of behavior by the brain. *Psychological Review*, 70(1), 19-39.

- Castro, S. E., Chico, P. F., Gordillo, D. L. & Portugal, R. A. (2007). Neurotransmisores del sistema límbico. Hipocampo, Gaba y memoria. Primera parte. *Salud Mental*, 30(4), 7-15.
- Celie, P. H., Kasheverov, I. E., Mordvintse V, D. Y., Hogg, R. C., Van Nierop, P., Van Elk, R., Van Rossum-Fikkert, S. E., Zhmak, M. N., Bertrand, D., Tsetlin, V., Sixma, T. K. & Smit, A. B. (2005). Crystal structure of nicotinic acetylcholine receptor homolog AChBP in complex with an alpha-conotoxin PnIA variant. *Nature Structural y Molecular Biology*, 12(7), 582-588.
- Champtiaux, N., Gotti, C., Cordero-Erausquin, M., David, D. J., Przybylski, C., Lena, C., Clementi, F., Moretti, M., Rossi, F. M., Le Novere, N., McIntosh, J. M., Gardier, A. M. & Changeux, J. P. (2003). Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knockout mice. *Journal Neuroscience*, 23(1), 7820-7829.
- Changeux, J. P. & Edelstein, S. J. (1998). Allosteric receptors after 30 years. *Neuron*, 21(5), 959-980.
- Chávez-Noriega, L. E., Crona, J. H., Washburn, M. S., Urrutia, A., Elliott, K. J. & Johnson, E. C. (1997). Pharmacological characterization of recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 2\beta 2$, $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 4$ and $\alpha 7$ expressed in *Xenopus oocytes*. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(1), 346-356.
- Combi, R., Dalpra, L., Tenchini, M. L. & Ferini-Strambi, L. (2004). Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy-a critical overview. *Journal Neurology*, 251(1), 923-34.
- Corringer, P. J., Le Novere, N. & Changeux, J. P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40(1), 431-458.
- Costa, B. Y. (2014). Alteraciones de la memoria implícita y explícita en el envejecimiento natural y en la demencia tipo Alzheimer. Tesis doctoral, Universidad de Abat Oliba CEU. Barcelona, España.

- Court, J. A., Piggott, M. A., Lloyd, S., Cookson, N., Ballard, C. G., Mckeith, I. G., Perry, R. H. & Perry, E. K. (2000). Nicotine binding in human striatum: elevation in schizophrenia and reductions in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Alzheimer's disease and in relation to neuroleptic medication. *Neuroscience*, 98(1), 79-87.
- Crooks, P. A., Bardo, M. T. & Dwoskin, L. P. (2014). Nicotinic receptor antagonists as treatments for nicotine abuse. *Advances in Pharmacology*, 69(1), 513-551.
- Dani, J. A. & Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 699-729.
- Dávila, C. V. V. (2013). Neuroresearch, neurociencias y marketing. Tesis de maestría. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.
- De Fiebre, C. M., Meyer, E. M., Henry, J. C., Muraskin, S. I., Kem, W. R. & Papke, R. L. (1995). Characterization of a series of anabaseine derived compounds reveals that the 3-(4)-dimethylaminocinnamylidene derivative is a selective agonist at neuronal nicotinic alpha-7/125 I-alpha-bungarotoxin receptor subtypes. *Molecular Pharmacology*, 47(1), 164-171.
- Decker, M. W., Brioni, J. D., Bannon, A. W. & Arneric, S. P. (1995). Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. *Life Science*, 56(1), 545-70.
- Del Barrio, D. L. (2010). Señales de calcio intracelulares mediadas por distintos subtipos de receptores nicotínicos y su implicación en los procesos de neuroprotección. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina. Madrid, España.
- Delis, D. C. & Kramer J. H. (2000). Advances in the neuropsychological assessment of memory disorders. En F. Boller & J. Grafman (Eds.), *Handbook of Neuropsychology* (2nd ed., Vol. 2, pp. 25-47). Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Domínguez, E. L. (2010). Efectos de la cocaína y del tolueno sobre la neurogénesis en el hipocampo de rata. Tesis doctoral, Universidad de Valencia. España.

- Dwoskin, L. P. & Crooks, P. A. (2001). Competitive neuronal nicotinic receptor antagonists: A new direction for drug discovery. *The Journal of Pharmacology*, 298(2), 395-402.
- Dwoskin, L. P., Wooters, T. E., Sumithran, S. P., Siripurapu, K. B., Joyce, B. M. & Lockman, P. R. (2008). Alkane-diyl-bis-3-picoliniums as nicotinic receptor antagonists: Inhibition of nicotine-induced dopamine release and hyperactivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(1), 563–576.
- Eichenbaum, H. (1992). The hippocampal system and declarative memory in animals. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 4(3), 217-231.
- Eichenbaum, H. (1996). Is the rodent hippocampus just for 'place'?. *Current Opinion in Neurobiology*, 6(2), 187-195.
- Ellison, M., Haberlandt, C., Gomez-Casati, M. E., Watkins, M., Elgoyhen, A. B., McIntosh, J. M. & Olivera, B. M. (2006). Alpha-RgIA: a novel conotoxin that specifically and potently blocks the alpha 9 alpha10 nAChR. *Biochemistry*, 45(1), 1511-1517.
- Ellison, M., McIntosh, J. M., Olivera, B. M. (2003). Alphaconotoxins Iml and ImII. Similar alpha 7 nicotinic receptor antagonists act at different sites. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 757-764.
- Escalona, Q. E. (2009). Caracterización farmacológica y molecular del receptor nicotínico para la acetilcolina en la célula cromafín bovina. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina. Madrid, España.
- Flores, C. M., Rogers, S. W., Pabreza, L. A., Wolff, B. B. & Kellar, K. J. (1992). A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha4-subunit and beta2-subunit and is up regulated by chronic nicotine treatment. *Molecular Pharmacology*, 41(1), 31–37.
- Flores, S. M. E. & Segura T., J. E. (2005). Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarinico y nicotínico. *Revista Mexicana de Neurociencias*, 6(4), 315-326.
- Garín, A. M. E. (2014). Efecto de la inactivación reversible del hipocampo dorsal sobre la retención de una tarea de evitación inhibitoria sobrerreforzada. Tesis doctoral. Instituto de Neurobiología Campus

Juriquilla. Universidad Nacional Autónoma de México. Querétaro, México.

- Garín-Aguilar, M. E., López V., S., Martínez V., .C. L., Valencia del Toro, G., Soto-Hernández, M. R. & Prado-Alcalá, R. A. (2009). Erisodina y receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo dorsal en la consolidación de la memoria. *Revista Latinoamericana de Química*, 37(3), 206-217.
- Gerzon, G. M. (2010). Participación de receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ del hipocampo ventral de rata en el aprendizaje de evitación. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México.
- Gotti, C. & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, 74(1), 363-396.
- Gramunt, F. N. (2008). Normalización y validación de un test de memoria en envejecimiento normal, deterioro cognitivo leve y enfermedad de Alzheimer. Tesis doctoral. Universidad Ramon Llul. Barcelona, España.
- Granon, S., Faure, P. & Changeux, J. P. (2003). Executive and social behaviors under nicotinic receptor regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 100(1), 9596-9601.
- Guadarrama, L., Escobar, A. & Zhang, L. (2006). Bases neuroquímicas y neuroanatómicas de la depresión. *Revista Facultad de Medicina*, 49(2), 66-72.
- Gutiérrez, G. B. E., Medina, N. R., Guevara, P. M. A. & Olvera, C. M. E. (2008). La eliminación de la serotonina del hipocampo facilita el aprendizaje e incrementa la potencia de la actividad theta de alta frecuencia del giro dentado, en la rata. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México.
- Harvey, S. C. & Luetje, C. W. (1996). Determinants of competitive antagonist sensitivity on neuronal nicotinic receptor beta subunits. *Journal of Neuroscience*, 16(1), 3798-806.
- Herz, A. (1960). Drugs and the conditioned avoidance response. *International Review of Neurobiology*, 2(1), 229-277.

- Hill, J. A. Jr., Zoli, M., Bourgeois, J. P. & Changeux, J. P. (1993). Immunocytochemical localization of a neuronal nicotinic receptor: The b2 subunit. *Journal of Neuroscience*, 13(4), 1551–1568.
- Hogg, R. C., Raggenbass, M. & Bertrand, D. (2003). Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 147(1), 1-46.
- Howieson, D. B. & Lezak, M. D. (2002). Separating memory from other cognitive problems. En: A. D. Baddeley, M. D. Kopelman & B. A. Wilson (Eds.). *The Handbook of Memory Disorders*, (pp. 639-654). London, John Wiley and Sons, Ltd.
- Ibarra, E. E. (2010). Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Texcoco, Edo de México.
- Inglis, F. M., Day, J. C. & Fibiger, H. C. (1994). Enhanced acetylcholine release in hippocampus and cortex during the anticipation and consumption of a palatable meal. *Neuroscience*, 62(4), 1049-1056.
- Izquierdo, I. & Medina, J. H. (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiology of Learning and Memory*, 68(3), 285-316.
- Jensen, A. A., Frølund, B., Liljefors, T. & Krosgaard-Larsen, P. (2005). Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(15), 4075-4745.
- Jones, S., Sudweeks, S. & Yakel, J. L. (1999). Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends in Neurosciences*, 22(12), 555-561.
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038.
- Kao, P. N., Dwork, A. J., Kaldany, R. R., Silver, M. L., Wideman, J., Stein, S. & Karlin, A. (1984). Identification of the alpha subunit half-cystine

- specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(19), 11662-11665.
- Karlin, A., 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(2), 102-114.
- Karlin, A., Cox, R. N., Dipaola, M., Holtzman, E., Kao, P.N., Lobel, P., Wang, L. & Yodh, N., (1986). Functional domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 463(1), 53-69.
- Kem, W. R., Mahnir, V. M. & Prokai, L. (2004). Hydroxy metabolites of the Alzheimer's drug candidate 3-[(2,4-dimethoxy) benzylidene]- anabaseine dihydrochloride (GTS-21): their molecular properties, interactions with brain nicotinic receptors, and brain penetration. *Molecular Pharmacology*, 65(1),56–67.
- Le Novere, N., Zoli M., Lena C., Ferrari R., Picciotto, M. R., Merlo-Pich, E. & Changeux, J. P. (1999). Involvement of $\alpha 6$ nicotinic receptor subunit in nicotine-elicited locomotion, demonstrated by in vivo antisense oligonucleotide infusion. *Neuroreport*, 10(1), 2497–2501.
- Lechner, H. A., Squire, L. R., & Byrne, J. H. (1999). 100 years of consolidation - Remembering Müller and Pilzecker. *Learning and Memory*, 6(2), 77-87.
- Lee, M., Martín-Ruiz, C., Graham, A., Court, J., Jaros, E., Perry, R., Iversen, P., Bauman, M. & Perry, E. (2002). Nicotinic receptor abnormalities in the cerebellar cortex in autism. *Brain*, 125(1), 1483-95.
- Levin, E. D., Bradley, A., Addy, N. & Sigurani, N. (2002). Hippocampal $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptors and working memory. *Neuroscience*, 109(1), 757–765.
- Levin, E. D., Briggs, S. J., Christopher, N. C., Rose, J. E. (1993a). Chronic nicotinic stimulation and blockade effects on working memory. *Behavioral Pharmacology*, 4(1), 179–182.
- Levin, E. D., Christopher, N. C., Briggs, S. J. & Rose, J. E. (1993b). Chronic nicotine reverses working memory deficits caused by lesions of the fimbria or medial basalocortical projection. *Cognitive Brain Research*, 1(1), 137–143.

- López, V. S. (2007). Efecto de la administración intrahipocampal de erisodina sobre la consolidación de una tarea de evitación inhibitoria. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México.
- López-Valdés, H. E. & García-Colunga, J. (2003). La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del sistema nervioso central. *Salud Mental*, 26(3), 66-72.
- Luetje, C. W. & Patrick, J. (1991). Both alpha and beta-subunits contribute to the agonist sensitivity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Journal Neuroscience*, 11(1), 837-45.
- Lukas, R. J., Changeux, J. P., Le Novere, N., Albuquerque, E. X., Balfour, D. J., Berg, D. K., Bertrand, D., Chiappinelli, V. A., Clarke, P. B., Collins, A. C., Dani, J. A., Grady, S. R., Kellar, K. J., Lindstrom, J. M., Marks, M. J., Quik, M., Taylor, P. W. & Wonnacott, S., (1999). International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacological Reviews*, 51(2), 397-401.
- Maaswinkel, H., & Whishaw, I. Q. (1999). Homing with locale, taxon, and dead reckoning strategies by foraging rats: sensory hierarchy in spatial navigation. *Behavioural Brain Research*, 99(2), 143-152.
- Maguire, E. A., Burke, T., Phillips, J., & Staunton, H. (1996). Topographical disorientation following unilateral temporal lobe lesions in humans. *Neuropsychologia*, 34(10), 993-1001.
- Mark, G. P., Weinberg, J. B., Rada, P. V. & Hoebel, B. G. (1995). Extracellular acetylcholine is increased in the nucleus accumbens following the presentation of an aversively conditioned taste stimulus. *Brain Research*, 688(1-2), 184-188.
- Martínez, I., Quirarte, G. L., Díaz-Cintra, S., Quiroz, C., & Prado-Alcalá, R. A. (2002). Effects of lesions of hippocampal fields CA1 and CA3 on acquisition of inhibitory avoidance. *Neuropsychobiology*, 46(2), 97-103.

- Martín-Ruiz, C. M., Lee, M., Perry, R. H., Baumann, M., Court, J. A. & Perry, E. K. (2004). Molecular analysis of nicotinic receptor expression in autism. *Molecular Brain Research*, 123(1), 81-90.
- McCleron, .F J., Gilbert, D. G., Radtke, R. (2003). Effects of transdermal nicotine on lateralized identification and memory interference. *Human Psychopharmacology*, 18(1), 339–343.
- McGehee, D. S. & Role, L. W. (1995). Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Annual Review of Physiology*, 57(1), 521-546.
- McNaughton, B. L., Barnes, C. A., Gerrard, J. L., Gothard, K., Jung, M. W., Knierim, J. J. & Weaver, K. L. (1996). Deciphering the hippocampal polyglot: the hippocampus as a path integration system. *The Journal of Experimental Biology*, 199(1), 173-185.
- Mihalak, K. B., Carroll, P. I., & Luetje, C. W. (2006). Varenicline is a partial agonist at alpha4beta2 and a full agonist at alpha7 neuronal nicotinic receptors. *Molecular Pharmacology*, 10(1), 801–805.
- Millán, C. A. (2003). Mecanismos moduladores de la liberación de glutamato en corteza cerebral: imagen de calcio de terminales sinápticos. Tesis doctoral. Madrid, España.
- Miller, G. A. (1956). The magical number seven, plus or minus two: some limits on our capacity for processing information. *Psychological Review*, 63, 81-97.
- Milner, B. (1966). Amnesia following operation on the temporal lobes. En: C. W. M. Whitty & O. L. Zangwill (Eds.). *Amnesia*. London: Butterworths.
- Miranda, M. I., Ramirez-Lugo, L. & Bermudez-Rattoni, F. (2000). Cortical cholinergic activity is related to the novelty of the stimulus. *Brain Research*, 882(1-2), 230-235.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. & Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, 423(6943), 949-955.
- Morgado, I. (2005). Psicobiología del aprendizaje y la memoria: fundamentos y avances recientes. *Revista de Neurología*, 14(5), 289-297.

- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P. & Keefe, J. O. (1982). Place navigation in paired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297(5868), 681-3.
- Moser, E., Moser, M. B., & Andersen, P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *The Journal of Neuroscience*, 13(9), 3916-3925.
- Moser, M. B., & Moser, E. I. (1998). Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus*, 8(6), 608-619.
- Navarrete, F., Pérez-Ortiz, J. M., Femenía, T., García-Gutiérrez, M. S., García-Payá, M. E., Leiva-Santana, C. & Manzanares, J. (2008). Métodos de evaluación de trastornos cognitivos en modelos animales. *Revista de Neurología*, 47(3), 137-145.
- Neil, D. A. (1988). Experimental studies on species relationship in *Erythrina* (Laguminosae: Papilionoideae). *Annals Missouri Botanical Garden*, 75(1), 886-969.
- Olivos, O. L. A. (2007). Caracterización farmacológica y funcional de la subunidad $\alpha 9\alpha 10$ del receptor nicotínico de la célula cromafín de la médula de la rata. Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Olton, D. S. (1983). Memory functions and the hippocampus. En W. Seifert (Ed.), *Neurobiology of the hippocampus* (pp. 335-374). New York: Academic Press.
- Olton, D. S., & Papas, B. C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, 17(6), 669-682.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.) San Diego, Academic Press.
- Pedersen, S. E. & Cohen, J. B. (1990). Dextro tubocurarine binding sites are located at alpha-gamma and alpha-delta subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(7), 2785-2789.

- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (2001). Combinatorial amygdala inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Research Reviews*, 38(1-2), 247-289.
- Picciotto, M. R., Brunzell, D. H. & Caldarone, B. J. (2002). Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, 13(1), 1097-106.
- Picciotto, M. R., Caldarone, B. J., Brunzell, D. H., Zachariou, V., Stevens, T. R. & King, S. L. (2001). Neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit knockout mice: physiological and behavioral phenotypes and possible clinical implications. *Pharmacology Therapeutics*, 92(1), 89-108.
- Pino-Rodríguez, S., Prieto-González, S., Pérez-Rodríguez, M. E. & Molina-Torres. (2003). Género *Erythrina*: Fuente de Metabolitos Secundarios con Actividad Biológica. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(2), 252-258.
- Power, A. E., Vazdarjanova, A. & McGaugh, J. L. (2003). Muscarinic cholinergic influences in memory consolidation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 80(3), 178-193.
- Quik, M. & Kulak, J. M. (2002). Nicotine and nicotinic receptors; relevance to Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 23(1), 581-94.
- Quirarte, G. L. & Prado-Alcalá, R. A. (2004). Therapeutic effect of increased experience: Protection against experimental amnesia. *International Journal of Clinical and Health Psychology*, 4(1), 161-172.
- Reiner, P. B. & Fibiger, C. H. (2000). Functional heterogeneity of central cholinergic systems. Disponible en: <http://www.acnp.org/g4/GN401000013/Default.htm>.
- Robles, A. C. (2014). Efecto del alcaloide erisopina obtenido de *Erythrina americana* en los receptores nicotínicos neuronales $\alpha 4\beta 2$. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Tlalnepantla, Estado de México.
- Rodríguez-Landa, J. F. & Contreras, C. M. (1998). Algunos datos recientes sobre la fisiopatología de los trastornos por ansiedad. *Revista Biomedica*, 9(3), 181-191.

- Rolls, E. T. (1996). A theory of hippocampal function in memory. *Hippocampus*, 6(6), 601-620.
- Ruetti, E., Justel, N. & Bentosela, M. (2009). Perspectivas clásicas y contemporáneas acerca de la memoria. *Suma Psicológica*, 16(1), 65-83.
- Ruiz, R.A.L. & Lopera, R.F. (2008). Memoria explícita en el trastorno depresivo mayor. *Iatreia*, 21(2), 177-185.
- Salazar, G. S. (2011). Alcaloides de pemoche (*Erythrina herbacea* L.) como larvicidas contra el mosquito de la fiebre amarilla (*Aedes aegypti* L.). Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Texcoco, Edo de México.
- Sargent, P. B. (2000). The distribution of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. In Neuronal Nicotinic Receptors; Clementi, F., Fornasari, D., Gotti, C., Eds.; *Handbook of Experimental Pharmacology* Vol 144 (pp. 163-184). Springer, Berlin.
- Sargent, P. B., (1993). The diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Annual Review of Neuroscience*, 16(1), 403-443.
- Sarter, M. & Bruno, J. P. (1997). Cognitive functions of cortical acetylcholine: toward a unifying hypothesis. *Brain Research Reviews*, 23(1-2), 28-46.
- Scoville, W. B. & Milner, B. (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 20(1), 11-21.
- Sharp, P. E. (1997). Subicular cells generate similar spatial firing patterns in two geometrically and visually distinctive environments: comparison with hippocampal place cells. *Behavioural Brain Research*, 85(1), 71-92.
- Sharples, C. G. V., Wonnacott, S. (2001). Neuronal nicotinic receptors. *Toxicology Reviews*, 19(1), 1-12.
- Sher, E., Chen, Sharples, T. J., Broad, L. M., Benedetti, G., Zwart, R., McPhie, G. I., Pearson, K. H., Baldwinson, T. & De Filippi, G. (2004). Physiological roles of neuronal nicotinic receptor subtypes: new insights on the nicotinic modulation of neurotransmitter release, synaptic

- transmission and plasticity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 4(1), 283-297.
- Shytle, R. D., Silver, A. A., Lukas, R. J., Newman, M. B., Sheehan, D. V. & Sanberg, P. R. (2002). Nicotinic acetylcholine receptors as targets for antidepressants. *Molecular Psychiatry*, 7(1), 525-35.
- Solís, H. & López-Hernandez, E. (2009). Neuroanatomía funcional de la memoria. *Archivo de Neurociencia*, 14(3), 176-187.
- Squire, L. R. (1987). *Memory: and brain*. Oxford: University Press.
- Squire, L. R. (2004). Memory system of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81(1), 171-177.
- Squire, L. R., & Davis, P. H. (1981). The pharmacology of memory: a neurobiological perspective. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 21(1), 323-356.
- Swanson, L. W. (1983). The hippocampus and the concept of the limbic system. En W., Seifert (Ed.), *Neurobiology of the hippocampus* (pp. 3-19). London, Academic Press.
- Tatsumi, R., Fujio, M., Satoh, H., Katayama, J., Takanashi, S., Hashimoto, K. & Tanaka, H. (2005). Discovery of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonists. (R)-3'-(5-Chlorothiophen-2'-yl)spiro-1-azabicyclo[2.2.2]octane-3,5'-[1',3']oxazolidin-2'-one as a novel, potent, selective, and orally bioavailable ligand. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(1), 2678–2686.
- Téllez, L. A. (2003). La memoria humana: revisión de los hallazgos recientes y propuesta de un modelo neuropsicológico. Tesis de maestría. Nuevo León, Monterrey, México.
- Tulving, E. (1983). *Elements of episodic memory*. Cambridge: Oxford University Press. En: Squire, L.R. (2004). Memory system of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, 81(1), 171-177.
- Unwin, N., (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 346(4), 967-989.
- Vann, S. D., Brown, M. W., Erichsen, J. T. & Aggleton, J. P. (2000). Fos imaging reveals differential patterns of hippocampal and

- parahippocampal subfield activation in rats in response to different spatial memory tests. *The Journal of Neuroscience*, 20(7), 2711-2718.
- Vázquez-Palacios, G. & Bonilla-Jaime, H. (2004). Receptores nicotínicos cerebrales y trastornos neuropsiquiátricos. *Revista de Neurología*, 39(12), 1146-1160.
- Vincler, M. (2005). Neuronal nicotinic receptors as targets for novel analgesics. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 14(1), 1191-8.
- Vincler, M., Wittenauer, S., Parker, R., Ellison, M., Olivera, B.M., & McIntosh, J. M. (2006). Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 17880-17884.
- Wada, E., Wada, K., Boulter, J., Deneris, E., Heinemann, S., Patrick, J. & Swanson, L. W. (1989). Distribution of $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\beta 2$ neuronal nicotinic receptor subunit mRNAs in the central nervous system: a hybridization histochemical study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 284(1), 314-335.
- Williams, M. & Robinson, J. L. (1984). Binding of the nicotinic cholinergic antagonist dihydro- β -erythroidine in rat brain, tissue. *Journal of Neuroscience*, 4(1), 2906-2911.
- Zoli, M., Le Novere, N., Hill, J. A. & Changeux, J. P. (1995). Developmental regulation of nicotinic receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *Journal of Neuroscience*, 15(3), 1912-1939.

XIV. ANEXOS

ANEXO 1. *ERYTHRINA*

XIV.1.1. Distribución y usos

El género *Erythrina*, perteneciente a la familia Fabaceae (Leguminosae) (Ibarra, 2010) ha sido seleccionado en diversos estudios por sus propiedades etnomédicas que se le atribuyen, además de considerar otros elementos como su potencial vegetal y la expectativa de novedad en su investigación. Este género comprende un amplio rango de variación morfológica y una gran diversidad ecológica. Las 115 especies descritas de árboles, arbustos y hierbas con semillas rojas e inflorescencias generalmente rojas (el nombre alude al color prevaleciente de las flores y deriva del griego *erythros* = rojo) las encontramos en las zonas tropicales y subtropicales del planeta distribuyéndose en Sudamérica, Centroamérica, Antillas mayores, Antillas menores y África occidental; 12 especies en Asia, 31 en el sur de África y casi 70 en América. El mayor número de especies de *Erythrina* se encuentran en México con 27, distribuidas en los estados de Chiapas, Guerrero, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y el Distrito Federal (Salazar, 2011; Pino-Rodríguez *et al.*, 2003). Pocas especies se han encontrado en zonas templadas: *E. herbacea* y *E. flabelliformis* (nativas del sur de Estados Unidos) y *E. crista-galli* y *E. falcata* (norte de Argentina) (Ibarra, 2010) Ver Figura 21.



Figura 21. Distribución del género *Erythrina* en el mundo (Modificado de Neil, 1988).

Un gran número de metabolitos secundarios, tales como los alcaloides, flavonoides, lectinas y pterocarpanos se han aislado a partir de especies del género *Erythrina* (Ver Figura 22) siendo utilizadas por la medicina tradicional de los pueblos de diversas regiones del mundo. Los países que se destacan por la utilización de estas plantas con fines curativos son: México (21%), India (20%), Perú (6%), Indonesia (4%), Papúa-Nueva-Guinea (3%), Kenya (3%), Argentina (3%), Brasil (3%), Tanzania (3%), Tailandia (3%), Rotuma (3%), Rwanda (3%) y Senegal (3%). Las especies reportadas con mayor frecuencia son *Erythrina variegata* L. (19%), *E. abyssinica* Lam (10%), *E. indica* Lam (8%), *E. fusca* Lour (8%), y *E. senegalensis* DC. (7%).

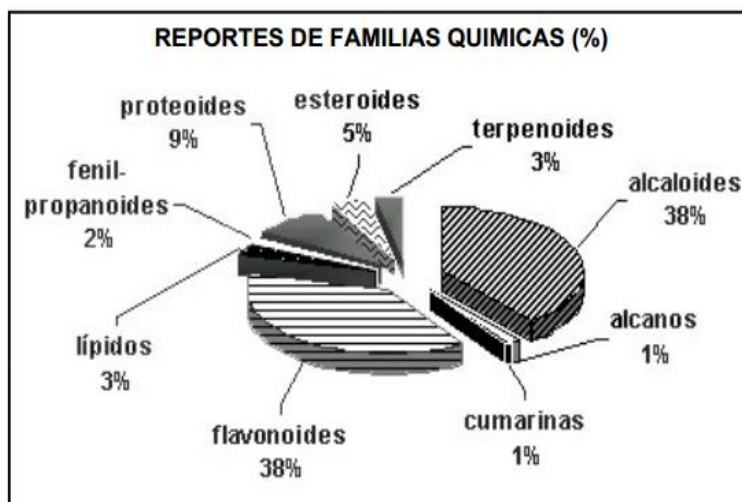


Figura 22. Principales familias químicas reportadas para las especies del género *Erythrina*

Los órganos vegetales de las especies de *Erythrina* más utilizados por la medicina tradicional son la corteza y las hojas, los cuales se reportan casi en igual porcentaje (33% y 31%, respectivamente). Las raíces, semillas y flores son órganos también utilizados por la población, aunque con menor frecuencia (12, 10 y 8%, respectivamente). Otras partes empleadas son las ramas, el tallo (y sus cortezas), los frutos y la planta entera. La utilización de la savia de la planta fue reportada para la *Erythrina variegata* y se ha utilizado en Nueva Caledonia para tratamientos de infertilidad en la mujer. Las principales propiedades etnomédicas atribuidas a estas especies vegetales son: alivio de dolores (7%); tratamiento de infecciones urinarias, respiratorias, infecciones de los ojos, piel y garganta (7%), para la fiebre (6%), cura de heridas (5%), para el tratamiento de trastornos menstruales (5%), procesos inflamatorios (4%), entre otras. Existe un reporte de la utilización de especies de *Erythrina* como alimento y otros referidos al uso de estas plantas como veneno para animales nocivos al hombre o peces (3%) (Pino-Rodríguez *et al.*, 2003) el cual actúa paralizando el músculo esquelético ya que inhiben la transmisión de impulsos nerviosos y causan hipotensión arterial (Salazar, 2011).

XIV.1.2. Alcaloides presentes en *Erythrina*

Los alcaloides son compuestos que presentan efectos fisiológicos y propiedades farmacológicas a bajas concentraciones. Gracias a la diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica de los alcaloides (Arango, 2008) hoy en día, las plantas son importantes en el desarrollo de la medicina moderna, dado que se utiliza como medio preventivo o curativo, esto gracias al efecto fisiológico que ejercen los metabolitos secundarios (principios activos de la planta) que tienen propiedades preventivas o curativas contra enfermedades. Pueden ser utilizados como antibióticos, antisépticos, como sedantes o analgésicos, o actuando sobre la actividad neuromuscular o muscular, así como también estimulantes en el sistema nervioso, etc. Los alcaloides más abundantes en *E. americana* son α - y β -eritroidina y pequeñas cantidades de Erisodina, Erisovina y Erisopina (Ibarra, 2010).

De un total de 393 reportes de alcaloides, 358 son del tipo isoquinolínico, lo que indica que este tipo de alcaloide es predominante y característico del

género *Erythrina*. Los alcaloides y los flavonoides son los metabolitos aislados en prácticamente todos los órganos vegetales de éste género mayormente utilizados para estudios fitoquímicos. Los alcaloides se han detectado con mayor frecuencia (76%) en las semillas, y los flavonoides (96%) en las raíces (Pino-Rodríguez *et al.*, 2003).

XIV.1.3. *Erythrina americana*

XIV.1.3.1. Características y distribución en México

E. americana es un árbol de 4-5m extendido, copa de ramas abundantes, corteza lisa y estaca café, tiene espinas en las ramas y espinas cónicas y anchas en el tronco, sus hojas son alternadas y trifoliadas, con tres puntas, foliolos rómbico-ovalados, de 7-22cm de largo y ancho. Estas especies se encuentran en tierras bajas y en elevaciones moderadas (1000-2100 m). Puede ser encontrada en el centro de México (Veracruz, Hidalgo, Estado de México, Guerrero, Puebla y Oaxaca (Ibarra, 2010) (Ver Figura 23).



Figura 23. Distribución de *Erythrina americana* en México

Esta especie contiene los alcaloides Erisovina, Erisodina, Erisopina y α y β eritroidina los cuales son bases terciarias. Tienen como base al esqueleto eritriniano, una espiroamina tetraciclina que se encuentra en dos formas en la planta: libre o conjugada formando glucósidos (Ibarra, 2010).

Dada la variación existente en los órganos vegetales estudiados, medios de extracción disponibles y particularidades específicas en la metodología de experimentación, es posible realizar numerosos ensayos diferentes a partir de una misma especie. La obtención de resultados positivos en un ensayo determina que la especie posea la actividad biológica en estudio aunque el resto de los ensayos sean negativos. Esto justifica la realización de estudios que permitan guiar rigurosamente la selección de las partes a estudiar, métodos de extracción y características de los modelos de bioactividad a ensayar, entre otros (Pino-Rodríguez *et al.*, 2003).

ANEXO 2. MODELOS ANIMALES

Los modelos animales de trastornos cognitivos se han basado mayoritariamente en primates, ratas y ratones, cuyos procesos neuronales son similares a los de la función cognitiva humana. Se pueden distinguir varios tipos de modelos experimentales.

- Modelos farmacológicos: permiten la evaluación de fármacos.
- Modelos genéticos: basados en animales manipulados genéticamente (transgénicos y knock-out)
- Modelos toxicológicos: para determinar la toxicidad de metales pesados, tóxicos y neurotoxinas

A la hora de abordar el estudio de la función cognitiva utilizando modelos animales debemos tener presentes sus múltiples dimensiones y decidir cuál de ellas deseamos investigar para elegir la prueba específica más apropiada.

XIV.2.1. MODELOS EN EL ESTUDIO DE LA MEMORIA Y EL APRENDIZAJE

XIV.2.1.1. Prueba de reconocimiento de objetos

XIV.2.1.2. Prueba de reconocimiento social

XIV.2.1.3. Memoria espacial

XIV.2.1.3.1. Laberinto acuático de Morris

XIV.2.1.3.2. Laberinto de Barnes

XIV.2.1.4. Memoria emocional

XIV.2.1.4.1. Condicionamiento aversivo al sabor

XIV.2.1.5. Aprendizaje asociativo

XIV.2.1.5.1. Prueba de evitación activa

XIV.2.1.5.2. Prueba de evitación pasiva

XIV.2.1.5.2.1. Cámara de evitación inhibitoria

XIV.2.1.1. Prueba de reconocimiento de objetos

El experimentador puede estudiar la memoria a corto y largo plazo modificando el intervalo de tiempo entre la primera exposición a dos objetos idénticos y las siguientes exposiciones, en las que se evalúa el grado de exploración del objeto familiar frente a otro nuevo Ver Figura 24.

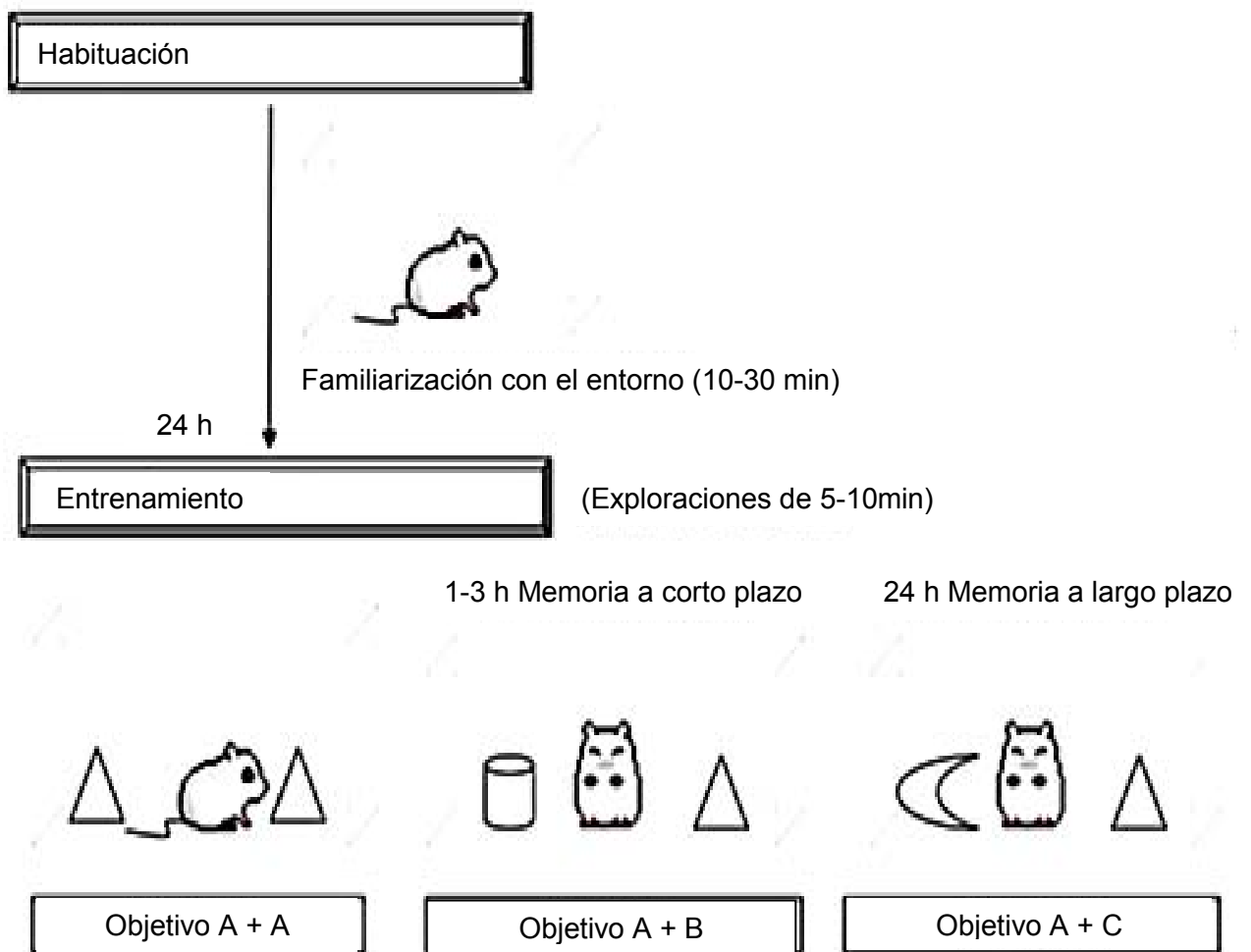


Figura 24. Modelo de prueba de reconocimiento de objetos (Tomado de Navarrete *et al.*, 2008).

XIV.2.1.2. Prueba de reconocimiento social

La exposición repetida del animal a un individuo familiar precede a una última confrontación con un individuo desconocido, momento en el que se evalúa el grado de interacción respecto al que se produjo con anterioridad Ver Figura 25.

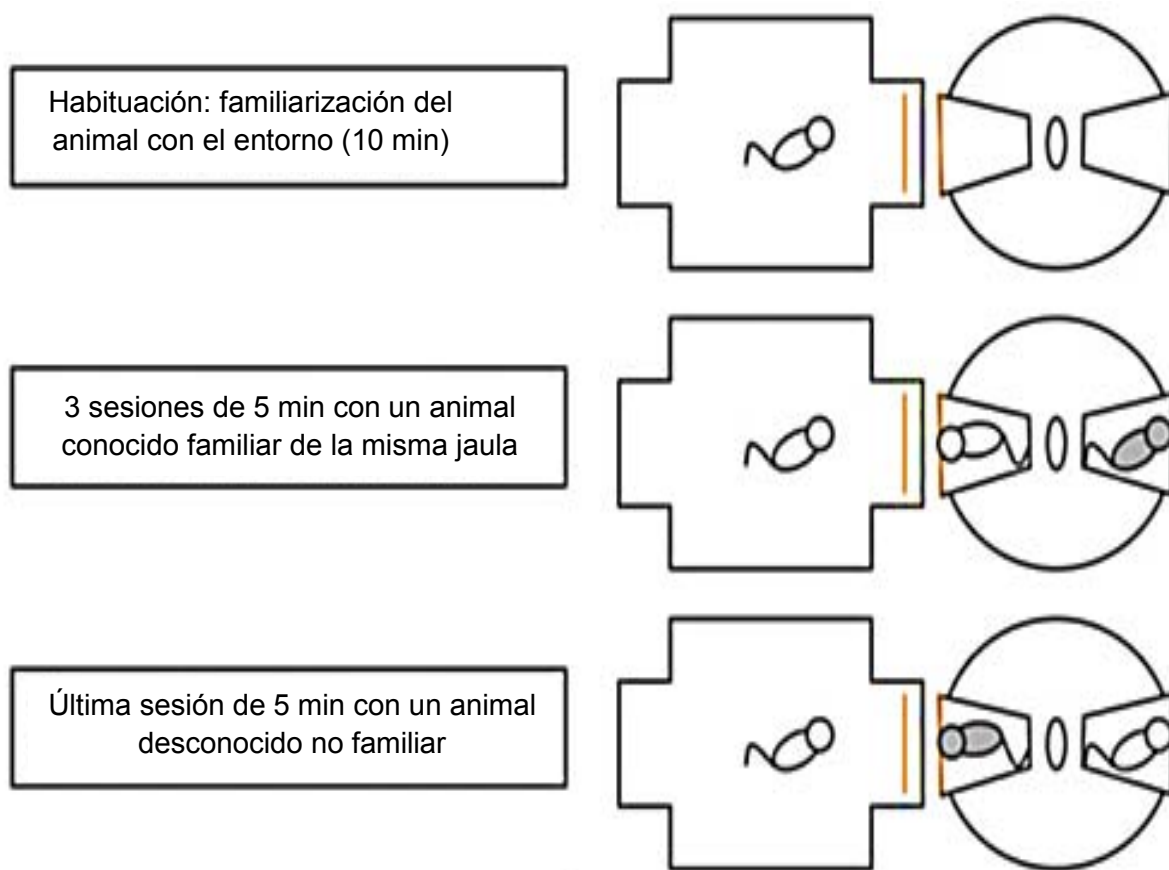


Figura 25. Modelo de prueba de reconocimiento social (Tomado de Navarrete *et al.*, 2008).

XIV.2.1.3. Memoria espacial

XIV.2.1.3.1. Laberinto acuático de Morris - En esta prueba se evalúa el tiempo de latencia que emplea el animal en alcanzar la plataforma sumergida, que representa un estímulo reforzante de escape. Si la plataforma permanece en el mismo lugar, se evalúa la memoria espacial de referencia, y si varía, se analiza la memoria espacial de trabajo Ver Figura 26.

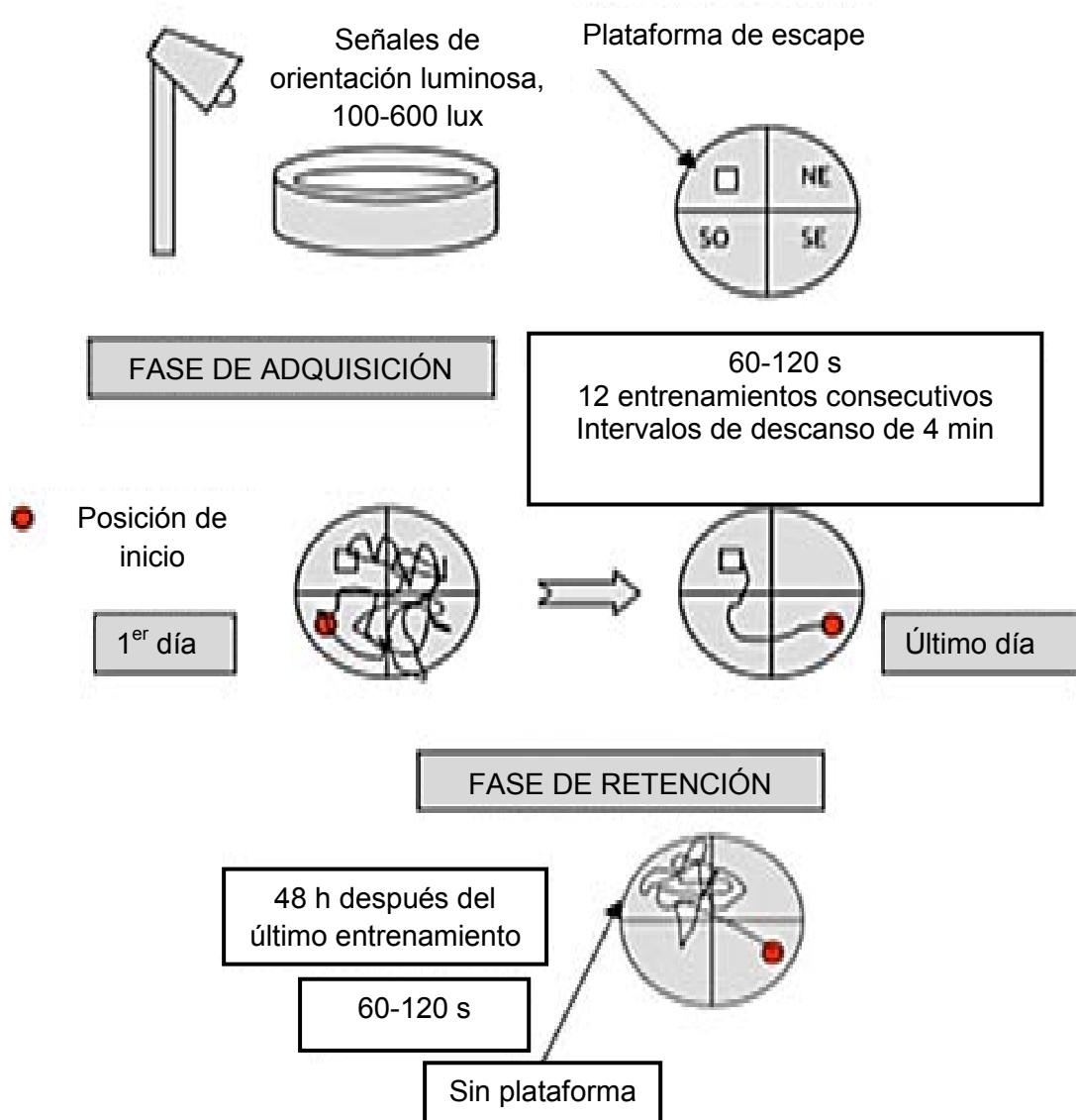


Figura 26. Modelo de laberinto acuático de Morris (Tomado de Navarrete *et al.*, 2008).

XIV.2.1.3.2. Laberinto de Barnes

El animal se sitúa primero en el centro del aparato en una cámara de inicio y a continuación se le deja que explore los diversos orificios ante la exposición a estímulos aversivos, como luces y sonidos. Se evalúa el tiempo que emplea en encontrar la salida que conduce al cajón refugio (Ver Figura 27).

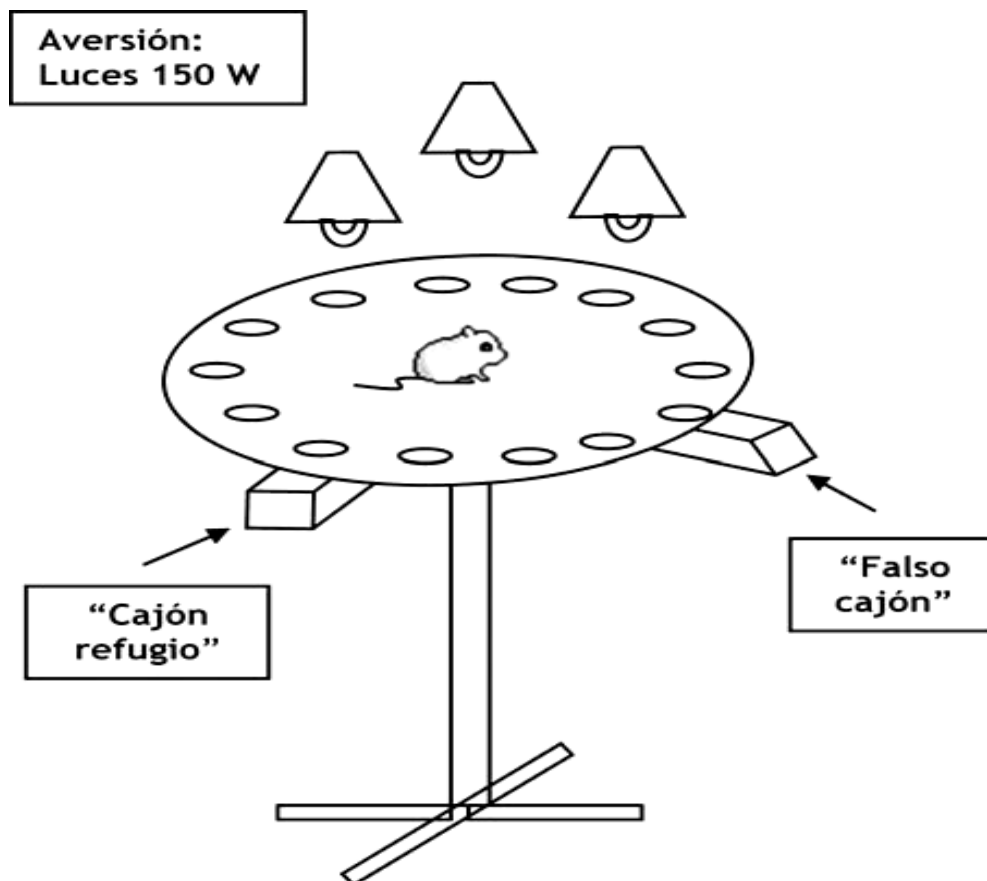


Figura 27. Modelo de laberinto de Barnes (Tomado de Navarrete *et al.*, 2008).

XIV.2.1.4. Memoria emocional

XIV.2.1.4.1. Condicionamiento aversivo al sabor

Para desarrollar el condicionamiento aversivo al sabor, el animal debe poder reconocer el estímulo condicionado y llegar a enfermarse con la exposición al estímulo no condicionado. Es importante que se desarrolle esta asociación entre el estímulo condicionado y el no condicionado para que finalmente, cuando se presente el estímulo condicionado sólo, el animal lo evite (Ver Figura 28).

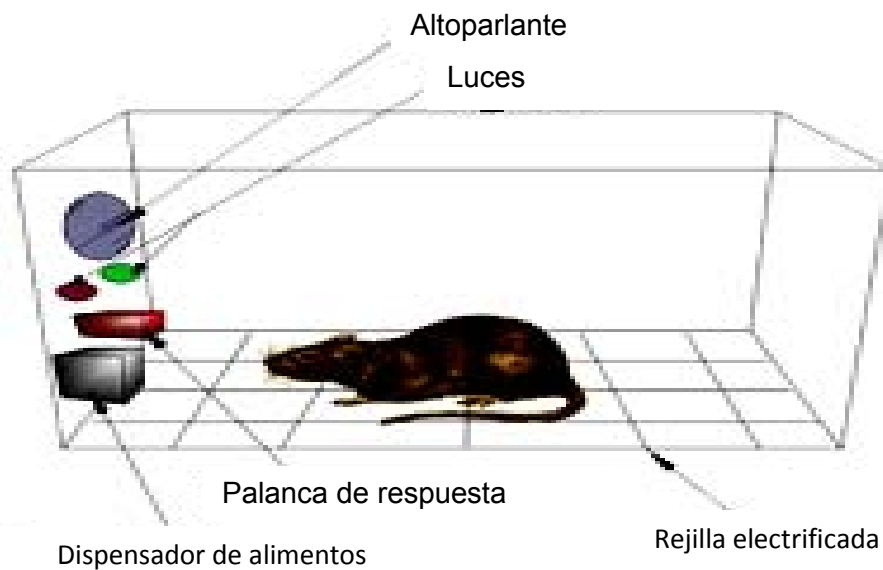


Figura 28. Modelo de condicionamiento aversivo al sabor (Tomado de Navarrete *et al.*, 2008).

XIV.2.1.5. Aprendizaje asociativo

XIV.2.1.5.1. Prueba de evitación activa

Las pruebas de evitación activa requieren varias sesiones de aprendizaje, a diferencia de las de evitación pasiva, en las que el ratón aprende en una sola sesión, pero nos permiten examinar funciones cognitivas complejas y valorar la adquisición y consolidación de la memoria en un mismo animal durante el experimento. La prueba de evitación activa se puede clasificar en evitación activa de un sentido y evitación activa de dos sentidos. La diferencia radica en que en la prueba de evitación activa de un sentido el ratón siempre recibe el *shock* eléctrico en la misma cámara/localización (es unidireccional), mientras que en la de dos sentidos el animal aprende, a través de diferentes pistas, a predecir la descarga eléctrica, independientemente de la cámara de ensayo (contexto) donde se produzca (es bidireccional).

XIV.2.1.5.2. Prueba de evitación pasiva

La prueba de evitación pasiva es una prueba unidireccional que permite estudiar el aprendizaje adquirido y la memoria. El animal se condiciona con un estímulo aversivo y posteriormente se valora si recuerda esa experiencia (Navarrete *et al.*, 2008).

XIV.2.1.5.2.1. Cámara de evitación inhibitoria

Para llevar a cabo esta prueba se utiliza una caja de acrílico transparente con dos compartimientos, uno claro y otro oscuro, separados entre sí por una puerta corredera (Ver Figura 29). El compartimiento claro tiene un piso que consta de barras paralelas de acero inoxidable con 1.0 centímetro de separación, hay una luz potente enfocando directamente al ratón, en el compartimiento oscuro hay un circuito cerrado con una plataforma de acero inoxidable conectado a un estimulador de corriente que producirá pequeñas descargas eléctricas. Se pretende que el ratón aprenda a evitar el compartimiento oscuro donde se le aplica la descarga (estímulo aversivo). La prueba comienza con un entrenamiento que consiste en colocar al ratón en el

compartimiento iluminado. A los 5 segundos se abre la puerta y se le permite dirigirse al compartimiento oscuro (el ratón tenderá espontáneamente a desplazarse a los espacios oscuros, pues la luz directa le produce ansiedad). En el momento en que el ratón entre con las cuatro patas en la cámara oscura se cerrará la puerta y recibirá una descarga eléctrica (mA) durante 5 segundos. Treinta segundos después de la aplicación de la descarga, se devuelve al ratón a su jaula hasta el momento de la prueba, que consiste en volver a poner el ratón en la cámara iluminada y levantar la puerta que separa las dos cámaras.

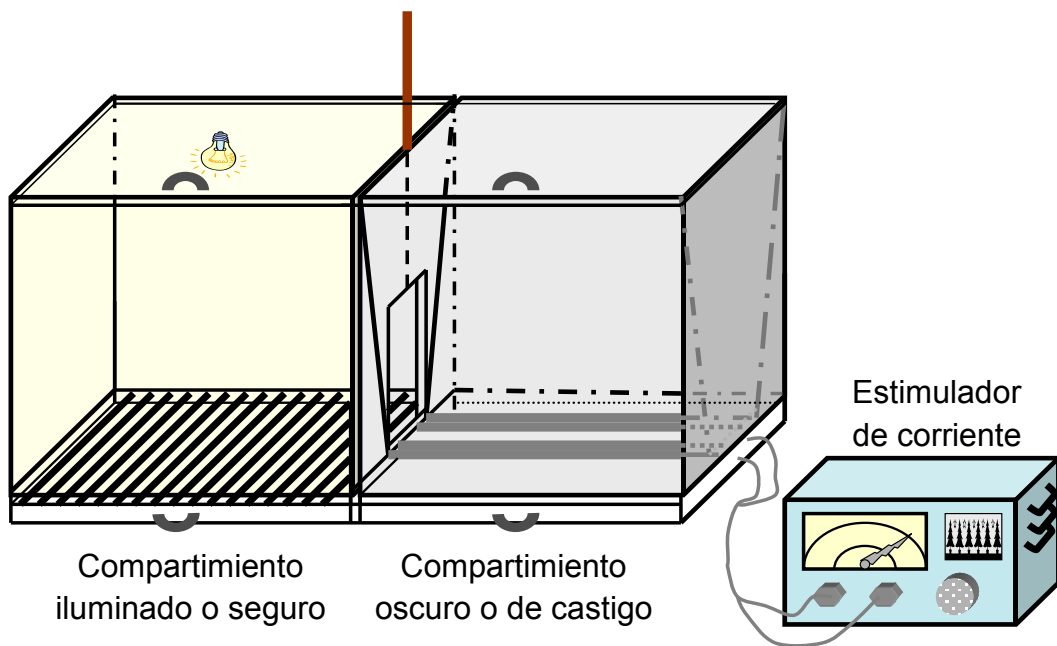


Figura 29. Esquema de la cámara de evitación inhibitoria. Esquema proporcionado por el Dr. Roberto Prado Alcalá.

Durante la prueba no se aplica al animal ninguna descarga y se observa durante 5 minutos, registrando diversos parámetros, entre los que se incluyen el tiempo de latencia hasta que entra en la cámara oscura (como indicador de memoria), el número de veces que cruza de una cámara a otra, el tiempo total que pasa en cada una de las cámaras y la frecuencia con la que se asoma a la cámara oscura hasta que realmente entra en ella. El ensayo se puede llevarse a cabo a los 30 o 60 minutos del entrenamiento, para evaluar la memoria a corto plazo, y a las 8 y 24 horas, para valorar la memoria a largo plazo. Las latencias cortas son consideradas como evidencia de amnesia, y las latencias largas como evidencia de retención y aprendizaje (McGaugh, 1973).

Con la utilización de éstos modelos animales podemos profundizar en las bases fisiopatológicas del deterioro que se produce por el simple hecho de envejecer o el que aparece asociado a diferentes situaciones patológicas, como las enfermedades neurodegenerativas. Además, nos permiten comprobar la eficacia de nuevos fármacos e identificar posibles dianas terapéuticas (Navarrete *et al.*, 2008).

ANEXO 3. PROCEDIMIENTO DE CIRUGÍA

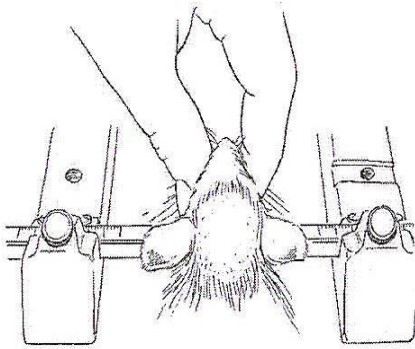


Figura 30. Forma en que fue colocada la ratita en el aparato estereotáxico

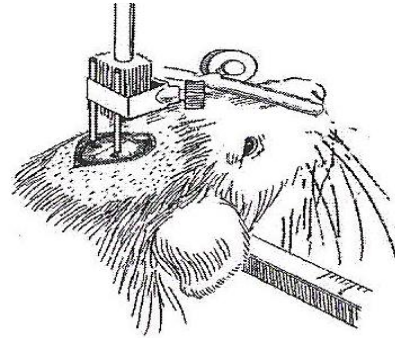


Figura 31. Colocación de las cánulas

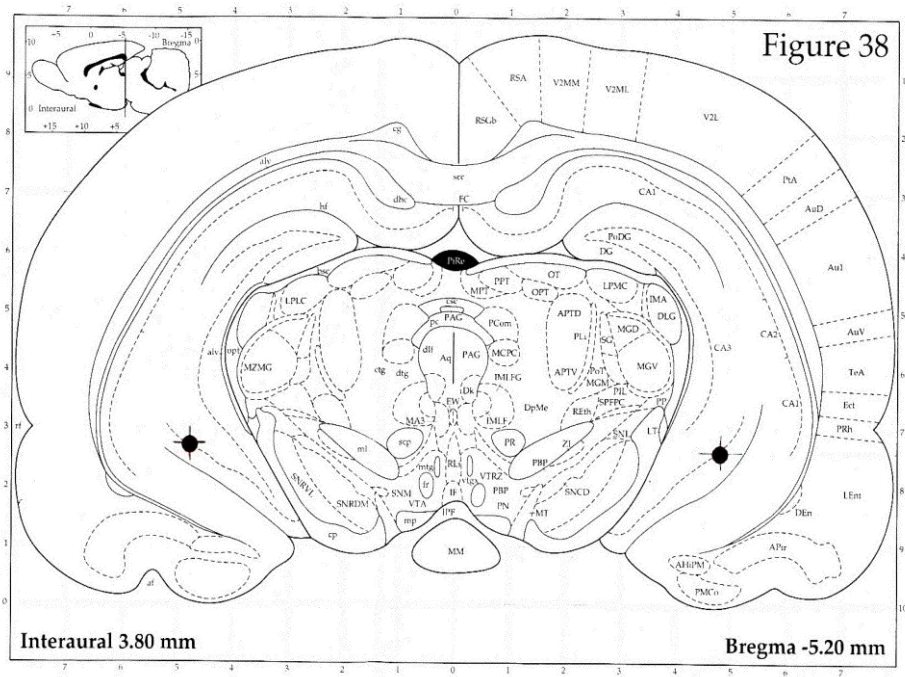
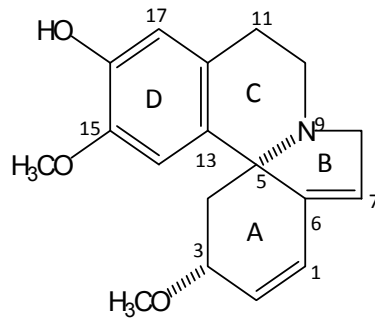


Figura 32. Esquema del corte de cerebro de ratita a la altura del hipocampo ventral, estructura a la cual se debió llegar con las cánulas (Tomado de Atlas de Paxinos & Watson, 2005).

ANEXO 4. ANÁLISIS QUÍMICO



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

Figura 33. Desplazamientos químicos del alcaloide Erisodina

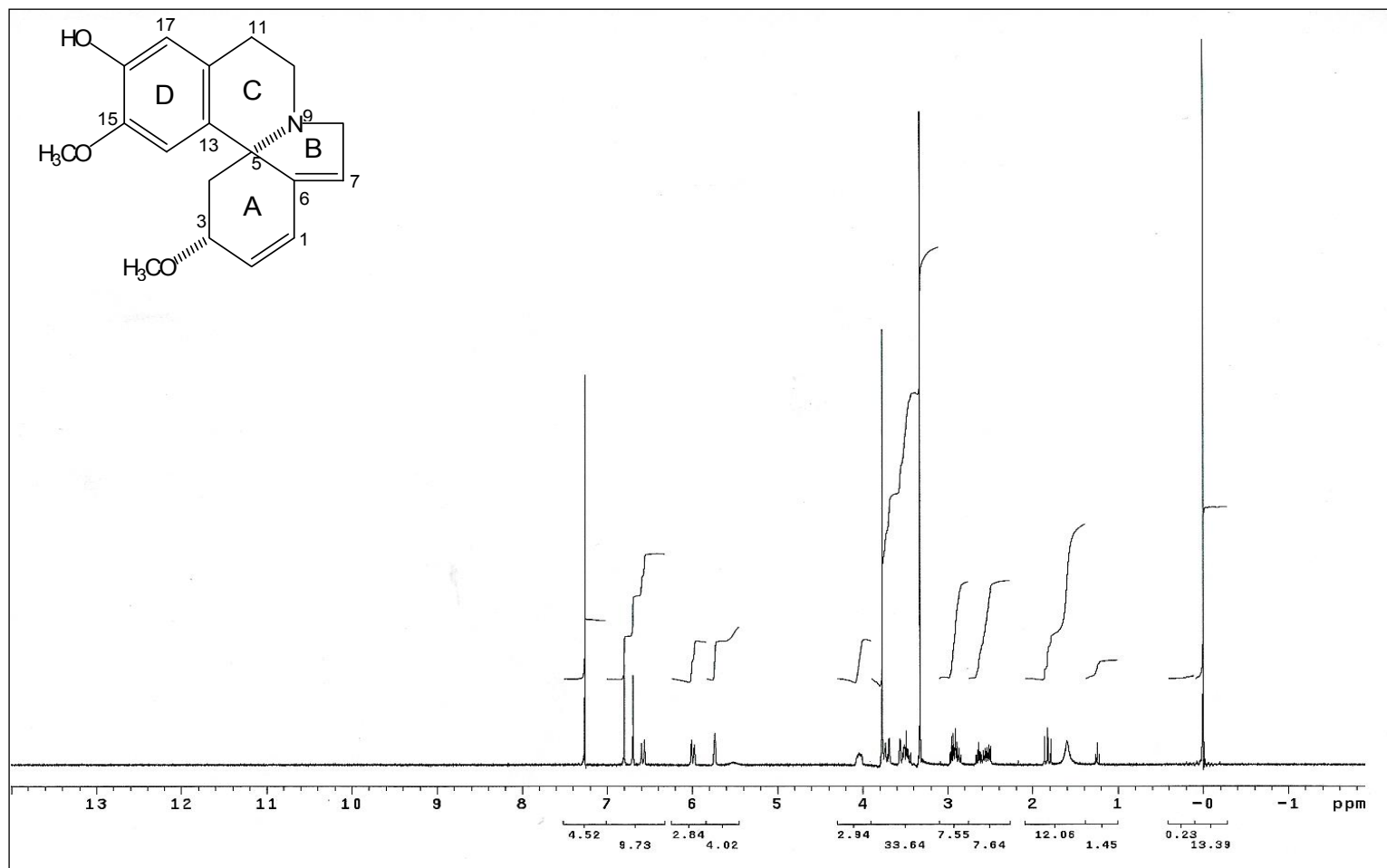


Figura 34. Espectro de ¹HMNR para Erisodina