

# Efecto de la ingestión de *Banisteriopsis caapi* y *Psychotria viridis* ‘Binomio ayahuasca’ en el hipocampo del cerebro de ratas

## Effect of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis* “Binomio ayahuasca” ingestion in the rat hippocampus

Américo Castro<sup>1,a</sup>, Norma Ramos<sup>1,a</sup>, José Juárez<sup>1,a</sup>, Luis Inostroza<sup>1,b</sup>, Juan Ponce<sup>1,b</sup>, Fritz Choquesillo<sup>1,b</sup>, Luis Félix<sup>1,b</sup>, Jackeline Escudero<sup>1,b</sup>, Arnaldo Navarro<sup>1,b</sup>, Susan Huaman<sup>1,b</sup>, Bryan Machaca<sup>1,b</sup>, Julio López<sup>1,c</sup>, Emilio Ramirez<sup>2,c</sup>, Julio Ruiz<sup>3,c</sup>, José Raez<sup>4,c</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, Lima, Perú.

<sup>2</sup> Escuela de Formación profesional, Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho, Perú.

<sup>3</sup> Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM, Lima-Perú.

<sup>4</sup> Instituto de Patología, Facultad de Medicina Humana, UNMSM, Lima-Perú.

<sup>a</sup> Químico Farmacéutico; <sup>b</sup> Estudiantes de Farmacia y Bioquímica; <sup>c</sup> Médico Patólogo.

### Resumen

**Objetivo.** Evaluar el efecto de la ingestión de *Banisteriopsis caapi* y *Psychotria viridis* ‘Binomio ayahuasca’ en el hipocampo de cerebro de ratas. **Diseño.** Estudio experimental, descriptivo, analítico, transversal. **Institución.** Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. **Material biológico.** Ratas. **Intervenciones.** Administración del binomio ayahuasca por vía orogástrica a ratas albinas adultas de la especie *Rattus norvegicus* y de cepa Holtzman. A siete grupos de cinco con un peso promedio de  $240 \pm 30$  g se les administró: (GI) blanco, (GII) 2,5 mL diazepam, (GIII) 0,7 mL solución de *Banisteriopsis caapi*, (GIV) 0,7 mL *Psychotria viridis*, y a los grupos (GV), (GVI) y (GVII) se administró 0,7 mL, 3,5 mL y 7,0 mL de solución del binomio ayahuasca, respectivamente. **Principales medidas de resultados.** Macroscópicos: comportamiento de reflejos y actividad motora. Microscópicos: número de células piramidales y granulosas, y desorganización celular. **Resultados.** En el tamizaje fitoquímico del extracto se caracterizó presencia de alcaloides, antraquinonas, triterpenoides y esteroides, fenoles, flavonoides y saponinas. Los volúmenes de droga administradas a los grupos de intervención con el binomio en la dosis de 0,7 mL manifestaron significativo aumento en el número de células granulosas sobre las células piramidales; a dosis de 3,5 mL el número de células granulosas fue menor con presencia de células piramidales grandes y pequeñas; y a dosis de 7,0 mL se manifestó desorganización celular, presencia de células piramidales grandes y pequeñas, y aumento de células granulosas. **Conclusiones.** El extracto alcohólico del binomio ayahuasca presenta efecto neuropatológico en el hipocampo del cerebro de ratas.

**Palabras clave.** *Banisteriopsis caapi*; *Psychotria viridis*; Binomio Ayahuasca; Rata, Hipocampo.

### Abstract

**Objective.** To assess the effect of *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis* ‘binomio ayahuasca’ ingestion in rat hippocampus. **Design.** Experimental, descriptive, analytical, and cross-sectional study. **Institution.** Research Institute of Pharmaceutical Sciences and Natural Resources, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru. **Biological material.** Rats. **Interventions.** Orogastric administration of ‘binomio ayahuasca’ in adult *Rattus norvegicus albinus* Holtzman strain. Seven groups of five animals with an average weight of  $240 \pm 30$  g were administered: (GI) placebo, (GII) 2.5 mL of diazepam (GIII) 0.7 mL of *Banisteriopsis caapi* solution, (GIV) 0.7 mL of *Psychotria viridis* solution. Groups GV, GVI and GVII received 0.7 mL, 3.5 mL and 7.0 mL of binomio ayahuasca solution, respectively. **Main outcome measures.** Macroscopically: reflex movements and motor skills. Microscopically: amount of pyramidal and granule cells, cell disorganization. **Results.** The phytochemical screening of the extract showed alkaloids, anthraquinones, triterpenoids and steroids, phenols, flavonoids and saponins. The group administered with 0.7 mL of binomio (GV) had a significant increase in the number of granule cells over pyramidal cells. The group administered with 3.5 mL of binomio (GVI) had less granule cells and large and small pyramidal cells. The group administered with 7.0 mL of binomio (GVII) had cell disorganization, large and small pyramidal cells and an increase in granule cells. **Conclusions.** The alcoholic extract of binomio ayahuasca showed a neuropathological effect on rat brain hippocampus.

**Keywords.** *Banisteriopsis caapi*; *Psychotria viridis*; Binomio ayahuasca; Rat Hippocampus.

## INTRODUCCIÓN

La búsqueda y creación de conocimientos científicos en el estudio de las plantas nativas de nuestra selva, motivó el interés para realizar el estudio de dos especies como son *Banisteriopsis caapi* 'ayahuasca' y *Psychotria viridis* 'chacruna'.

Chacruna se presenta como un arbusto y pertenece a la familia *Rubiaceae*. La ayahuasca es una liana que tiene constituyentes psicoactivos utilizados en la práctica de la medicina tradicional y que se halla en los tallos y terminaciones del vegetal. La especie es de tipo enredadera y pertenece a la familia *Malpighiaceae*; sus ramas son de gran tamaño y su corteza es lisa y de color pardo. Sus principios activos tienen potente acción sobre el sistema nervioso central. La especie es de clima tropical, se halla en toda la región Amazónica y es de origen milenaria entre las culturas de Perú, Colombia, Bolivia y Ecuador.

Su decocción, infusión o macerado alcohólico de la corteza, al ser mezclado con las hojas de chacruna, constituye el llamado 'binomio ayahuasca', que potencia la actividad psicoactiva de sus constituyentes químicos, ejerciendo aumento y duración del trance al ser consumido <sup>(1)</sup>, y contiene compuestos beta carbolinos, la harmina, harmalina, tetrahydroharmina y agenina, que producen efectos relajantes, siendo la harmina el alcaloide mayoritario. La chacruna contiene entre otros componentes N-dimetiltriptamina (DMT) como alcaloide mayoritario, responsable de la acción psicotrópica. Al ingerir la mezcla, en el organismo los alcaloides de la ayahuasca inhiben temporalmente la acción de la enzima monoaminooxidasa (MAO) en el sistema digestivo, favoreciendo la absorción de la DMT, originando el efecto alucinógeno <sup>(2,3)</sup>.

Sobre la ayahuasca se han realizado estudios relacionados con su composición química, aspectos botánicos, etnográficos y farmacológicos, extendiéndose a investigaciones químicas para determinar su potencial terapéutico y aplicación en prácticas psiquiátricas, y

conocer la acción aguda crónica, toxicológica, fisiológica y farmacocinética de sus alcaloides.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la ingestión de *Banisteriopsis caapi* y *Psychotria viridis* en el hipocampo del cerebro de ratas in vivo utilizando un ensayo biológico y análisis histopatológico.

## MÉTODOS

La investigación fue aplicada, de tipología experimental, y el diseño fue descriptivo, analítico, transversal. Las dos especies fueron colectadas en Contamana, Departamento de Iquitos, Perú. Las muestras fueron clasificadas taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

En la obtención del extracto se trabajó la corteza de ayahuasca y hojas chacruna por separado; fueron sometidas a un proceso de maceración por siete días con etanol de 96° a temperatura ambiental. Posteriormente, se filtró, concentró y almacenó en frascos de color ámbar, teniéndose en refrigeración a temperatura de 4°C. Los extractos se mezclaron en relación de tres de ayahuasca y siete de chacruna con agua destilada, para formar el binomio ayahuasca. La caracterización de los metabolitos secundarios de los ex-

tractos se efectuó con la aplicación de reactivos de coloración y precipitación específicos <sup>(4)</sup>.

Se utilizó 35 ratas albinas hembras adultas cepa Holtzman de la especie *Rattus norvegicus* y de un peso promedio de 250 g, que fueron distribuidas en siete grupo de cinco: grupo (GI) blanco, grupo (GII) (2,5 mL de solución de diazepam), grupo (GIII) (0,7 mL solución de *Banisteriopsis caapi*), grupo (GIV) (0,7 mL de solución de *Psychotria viridis*) y los grupos (V), (VI) y (VII) 0,7, 3,5 y 7,0 mL de solución del binomio ayahuasca, respectivamente. Los extractos se administraron dos veces por semana durante un mes. Los grupos intervenidos después de la administración de los extractos, estuvieron sometidos al análisis de observación de sus comportamientos, actividad motora, reflejo, sedación, somnolencia, pasividad, temblores faciales, frotamiento corporal, diuresis, defecación, irritabilidad y respuesta al tacto.

Después de 24 horas del tratamiento de la administración de los extractos, los animales fueron sacrificados con pentobarbital sódico por vía intracardiaca, retirándoles el cerebro y depositándolo en frascos que contenían solución de formol neutro estabilizado, para ser procesados en el análisis histopatológico. Las muestras de 2 µ de espesor se obtuvieron con micrótopo automático; fueron deshidratadas, tratadas con

Tabla 1. Tamizaje fitoquímico de los extractos de ayahuasca y chacruna.

Reacciones	Metabolitos	Ayahuasca	Chacruna
Dragendorff	Alcaloides	++++	+++
Mayer	Alcaloides	++++	++
Bertrand	Alcaloides	++++	+
Wagner	Alcaloides	+++	+++
Bortranger	Antraquinonas	+++	(-)
Bouchardat	Triterpenoides y esteroides	+++	++++
Cloruro férrico	Fenoles	++	+
Gelatina	Taninos	(-)	(-)
Shinoda	Flavonoides	++++	+
Espuma	Saponinas	++++	++++

Alta evidencia (++++), mediana evidencia (+++), escasa evidencia (++), no hay evidencia (-).

Tabla 2. Análisis macroscópico de los grupos intervenidos.

Grupos	Análisis macroscópico
(GI) blanco	*comportamiento natural *actividad motora espontánea *reflejos normales
(GII) diazepan 2,5 mL	*sedación *actividad motora recta
(GIII) ayahuasca	*actividad espontánea *respuesta al tacto *somnolencia leve
(GIV) chacruna 0,7 mL	*pasividad *somnolencia
(GV) binomio 0,7mL	*actividad motora reducida *respuesta al tacto *somnolencia por periodos *temblores faciales *acicalamiento ( <i>grooming</i> )
(GVI) binomio 3,5mL	*actividad motora reducida *temblores faciales *acicalamiento ( <i>grooming</i> ) *diuresis
(GVII) binomio 7,0mL	*actividad motora aumentada *somnolencia leve *respuesta al tacto *irritabilidad

parafina, teñidas con hematoxilina-eosina (HE) y observadas al microscopio LEICA DME de doble cabezal. La zona observada fue la rodilla del hipocampo a los aumentos de 100x y 400x y el conteo se realizó por campos a 400x. Se

tomó 4 campos, de los cuales se obtuvo el promedio para expresar los resultados que posteriormente fueron analizados por un solo experto en la determinación de los efectos neuropatológicos en el cerebro de ratas.

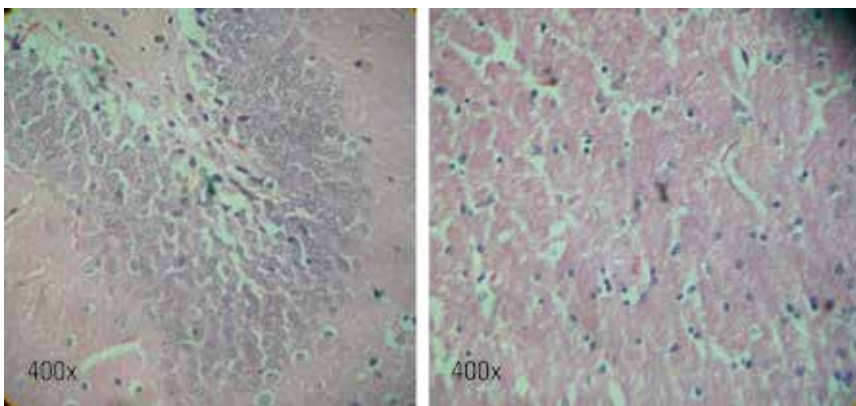


Figura 1. Blanco: Localización de la rodilla en la zona límbica. Células piramidales y células granulosas en normal cantidad. Organización celular normal.

## RESULTADOS

El estudio fitoquímico demostró la presencia de saponinas, esteroides y triterpenoides, fenoles, flavonoides y en mayor cantidad alcaloides (tabla 1).

El análisis macroscópico de los grupos intervenidos mostró pasividad y somnolencia a las menores concentraciones en los grupos (GIV) y (GV), a diferencia de lo que ocurrió en el grupo con mayor dosis (GVII) (tabla 2).

La evaluación del hipocampo a dosis de 0,7 mL manifestaron significativo aumento en el número de células granulosas, las cuales se caracterizaron por ser de forma redonda o esférica, de mediano y pequeño tamaño dependiendo de su localización, sobre las células piramidales, las cuales se diferenciaron por poseer dos dimensiones triangulares y ser de gran o pequeño tamaño, dependiendo de su localización. A dosis de 3,5 mL, el número de células granulosas fue menor, con presencia de células piramidales grandes y pequeñas, y a dosis de 7,0 mL se manifestó desorganización celular, presencia de células piramidales grandes y pequeñas, y aumento de células granulosas (tabla 3, figura 1 al 3).

## DISCUSIÓN

La ayahuasca es utilizada como medicina en la Amazonía peruana por los chamanes en la iniciación de rituales en los que invocan a los espíritus, creando un estado alucinógeno al mezclarla con otras plantas, como la *Psychotria viridis* y *Diplopterys cabrena* <sup>(5)</sup>.

Al realizar un corte transversal del cerebro de rata, se observa la longitud de la zona límbica y el hipocampo como lóbulo sensorial del cerebro donde se encuentra la rodilla y la ubicación del 'centro de la voluntad'; asimismo, el número y grosor de neuronas piramidales grandes y pequeñas, y neuronas granulosas en gran cantidad.

La ayahuasca, al afectar a las neuronas piramidales del 'centro de vo-

Tabla 3. Análisis histopatológico de los grupos intervenidos.

Grupos	Muestra	Células piramidales	Células granulosas
(GI) blanco	C1	1	200
	C2	38	150
	C3	6	100
(GII) diazepam 2,5 mL	C4	0	120
	C5 (edema)	20	80
	C6	5	80
(GIII) ayahuasca	C7 (edema)	26	Células aumentadas y en desorden
	C8	82	32
	C9	15	17
(GIV) chacruna 0,7 mL	C10	12	300
	C11	15	24
	C12	12	50
(GV) binomio 0,7 mL	C13	6	120
	C14	7	70
	C15	7	400
	C16 (edema)	6	200
	C17 (edema)	12	120
(GVI) binomio 3,5 mL	C18	40	50
	C19	4	28
	C20 (edema)	8	148
	C21	0	800
	C22 (edema)	8	80
(GVII) binomio 7,0 mL	C23	3	20
	C24 (edema)	2	10
	C25	0	200
	C26	4 anormales	80
	C27	0	120 Desorganización y degeneración

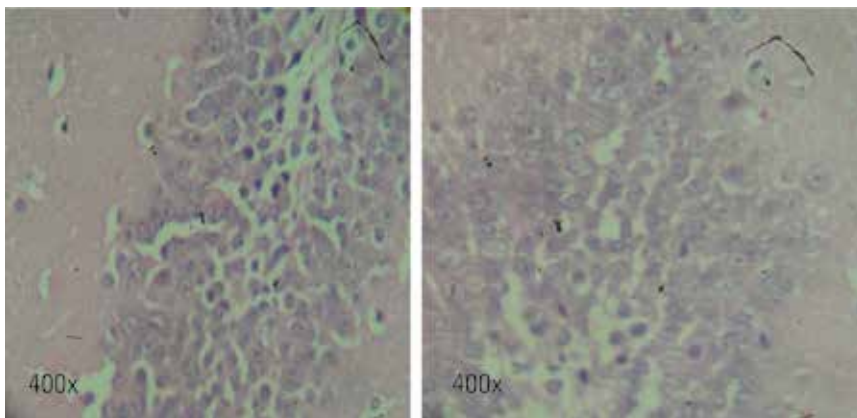


Figura 2. Binomio 0,7 mL: Significativo aumento en el número de células granulosas sobre las piramidales, que se encuentran disminuidas.

luntad<sup>7</sup>, no las reconstituye, pero sí las reactiva en su funcionamiento; estas neuronas son lábiles a drogas y agentes químicos, prolongándose por un solo y único axón (fibras nerviosas), y reuniéndose entre ellas para formar un fascículo piramidal que conecta el centro de las médula espinal, transmitiendo órdenes necesarias para realizar los movimientos motores voluntarios. Son neuronas motoras y exclusivas de la corteza cerebral, llegando a constituir verdaderas neuronas gigantes denominadas neuronas Betz, siendo estas neuronas piramidales las más grandes de toda la corteza cerebral; miden entre 90 y 100 micrones de diámetro <sup>(6,7)</sup>.

Las células granulosas representan casi la mitad de las neuronas del sistema nervioso central, son las células más pequeñas y las únicas neuronas excitatorias de la corteza cerebral; integran información de las diferentes fibras musgosas, generando diferentes patrones de actividad. La sinapsis de estas neuronas con las células de Purkinje se cree que es importante para el aprendizaje motriz <sup>(8,9)</sup>.

La acción de la composición química de ayahuasca y el potencial terapéutico que tiene, se viene realizando en investigaciones clínicas <sup>(10)</sup>. En investigación realizada de esta especie en humanos se ha demostrado que induce profundas modificaciones en la percepción, emoción y procesos cognitivos. El impacto de esta droga, a través de estudios de farmacología molecular implica estímulo neurotrópico asociado con la plasticidad sináptica, sugiriendo que podría potencializar cambios estructurales en el tejido de las células, trascendiendo esto en la personalidad humana <sup>(11)</sup>. Estos resultados se correlacionan con las obtenidas en nuestro estudio, en la alteración de las neuronas cerebrales. En otros estudios se ha observado la propiedad antidepressiva del binomio ayahuasca en ratas Wistar <sup>(12)</sup>. Así mismo, la ayahuasca viene siendo investigada en el tratamiento de los desórdenes neurodegenerativos de la enfermedad de Parkinson <sup>(13-15)</sup>. En la investigación de la composición

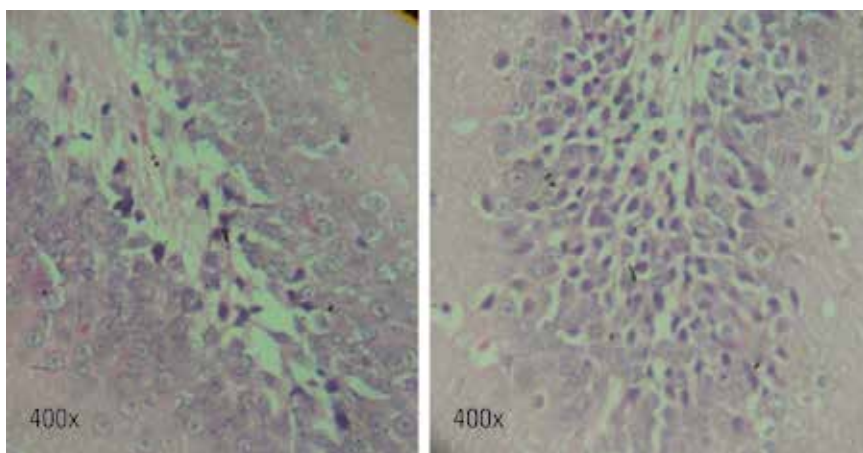


Figura 3. Binomio 3,5 mL. Número de células granulosas menor y presencia de células piramidales grandes y pequeñas.

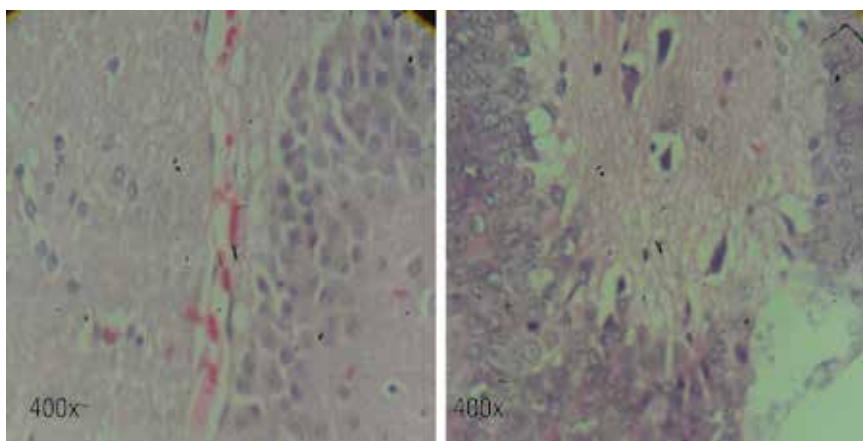


Figura 4. Binomio 7 mL. Desorganización celular, presencia de células piramidales grandes y pequeñas. Presencia aumentada del número de células granulosas.

química de esta planta, se ha descubierto nuevas bases orgánicas, como la amina N-óxido, ácido harmínico metil éster y ácido harmalínico, que podrían coadyuvar o tener alguna influencia en su potencial psicotrópico. El efecto de la combinación con *Psychotria viridis* se ha estudiado en el desarrollo psicométrico de la ansiedad y pánico en participantes que han ingerido la infusión de este binomio <sup>(16)</sup>.

En el análisis histopatológico del estudio realizado y con los volúmenes de droga administrados del binomio se visualizó aumento de células granulosas sobre las células piramidales, lo que explicaría la fase excitatoria de alucina-

ción en los animales de experimentación y en los consumidores <sup>(10)</sup>, además de la desorganización celular, la cual se presenta durante un periodo de adaptación tras la administración del binomio. Estos cambios morfológicos estarían relacionados con los cambios fisiológicos observados. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la ingestión de *Banisteriopsis caapi* y *Psychotria viridis* binomio ayahuasca en el hipocampo del cerebro de ratas, por medio de un bioensayo y análisis histopatológico.

En el presente estudio, las principales limitaciones a las que se enfrentaron los investigadores fueron el no existir antecedentes utilizados en este

tipo y diseño de investigación. Con la información y reconocimiento de las especies estudiadas y su efecto neuropatológico en el hipocampo del cerebro de ratas, se hace necesario continuar a través de investigaciones clínicas el potencial terapéutico que tendrían su aplicación y riesgos en su uso y abuso; por quienes se someten a experiencias alucinógenas por efectos de los principios activos que contienen estas plantas, con repercusiones graves no solo al sistema nervioso central; sino también al tejido sanguíneo y otros órganos de vital importancia para la salud y la vida.

Concluyendo, la mezcla de los extractos de *Banisteriopsis caapi* y *Psychotria viridis* binomio ayahuasca produce efecto neuropatológico en el hipocampo del cerebro de ratas; manifestándose por una disminución de células granulosas, ausencia de células piramidales grandes y pequeñas; y desorganización celular.

#### AGRADECIMIENTO

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por el apoyo brindado en la realización de esta investigación.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moura S, Garcia F, Dizioli C, Pinto E, Yonamine M. An applicable method for the determination of dimethyltryptamine in ayahuasca, a psychoactive plant preparation. *Phytochemistry letters*. 2010;3(2):79-83. DOI: 10.1016/j.phytol.2009.12.004.
2. Callaway J. Various alkaloids profiles in decoction of *Banisteriopsis caapi*. *J Psychoactive drugs*. 2005;37:151-5. DOI: 10.1080/02791072.2005.10399796.
3. Callaway J, McKenna D, Grob C, Brito G, Raymond L, Poland R, et al. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. *J Ethnopharmacol*. 1999;65:243-56. DOI: 10.1016/S0378-8741(98)00168-8.
4. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y productos naturales. La Habana: Instituto de farmacia y alimentos, Universidad de la Habana; 2000.
5. Young E, Oertel O. The synaptic organization of the brain. Oxford University press; 2004. DOI:10.1093/acprof:oso/9780195159561.003.0004.
6. Lina RR, Walton KD, Lang RJ. The synaptic organization of the brain. Oxford University Press; 2004. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780195159561.001.1.

7. Weedman D, Ryugo D. Projections from auditory cortex to the cochlear nucleus in rats: synapses on granule cell dendrites. *J Comparative Neurol.* 1996;37(2):311-24. DOI: 10.1002/ar.a.20300.
8. Feil R, Hartmann J, Luo C, Wolfsgruber W, Schilling K, Feil S, et al. Impairment of LTD and cerebellar learning by Purkinje cell specific ablation of GMPC –dependent protein kinase I. *J Cell Biol.* 2003;163(2):295-302. DOI: 10.1083/jcb.200306148.
9. Stankovic D, Mehmeti E, Svorc L, Kalcher K. New electrochemical method for the determination of b-carboline alkaloids, harmalol and harmine, in humans' urine samples and in *Banisteriopsis caapi*. *Microchem JI.* 2015;118:95-100. DOI: 10.1016/j.microc.2014.08.007.
10. Bouso J, Palhano-Fontes F, Rodríguez-Fornells A, Ribeiro S, Sanches R, Crippa J, et al. Long-term use of psychedelic drugs is associated with differences in brain structure and personality in humans. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2015;25(4):483-92. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2015.01.008.
11. Pic-Taylor A, Da Motta L, De Moraes J, Junior W, Santos A, Campos L, et al. Behavioural and neurotoxic effects of ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female wistar rat. *Behavioral Processes.* 2015;118:102-10. DOI: 10.1016/j.beproc.2015.05.004.
12. Wang Y, Samoylenko V, Tekwani B, Khan I, Miller L, Chaurasiya N, et al. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol.* 2010;128(3):662-71. DOI: 10.1016/J.Jep.2010.02.013.
13. Samoylenko V, Rahman M, Tekwani B, Tripathi L, Wang Y, Khan S, et al. *Banisteriopsis caapi*. A unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and Parkinson's disease. *J Ethnopharmacol.* 2010;127(2):357–67. DOI: 10.1016/J. J. Jep. 2009.10.030.
14. Schwarz M, Houghton P, Rose S, Jenner P, Lees A. Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to Parkinsonism. *Pharmacol Biochemistry Behavior.* 2003;75(3):627–33. DOI: 10.1016/S0091-3057(03)00129-1.
15. Hashimoto Y, Kawanishi K. New organic bases from Amazonian *Banisteriopsis caapi*. *phytochemistry.* 1975;15(7):1633–35. DOI: 10.1016/j.jep.2007.04.012.
16. Santos R, Landeira-Fernandez J, Motta V, Cruz A. Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daimé members. *J Ethnopharmacol.* 2007;112(3):507–13. DOI: 10.1016/j.jep.2007.04.012.

---

*Conflictos de interés: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.*

*Artículo recibido el 11 de mayo de 2016 y aceptado para publicación el 29 de setiembre de 2016.*

*Correspondencia:*

*Américo Jorge Castro Luna.*

*Celular: 987322500*

*Telefono UNMSM: 6197000-4823*

*Correo electrónico: Caslasha3@hotmail.com*