

EVALUACION DE LA CITOTOXICIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS CON ACTIVIDAD GABAÉRGICA.

Leticia E. Delgado-Marín¹, Gabriela N. Reiner^{1,2}, Eneida De Paula² y Daniel A. García¹,

¹Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas (IIBYT-CONICET-Universidad Nacional de Córdoba), Av. Vélez Sarsfield 1611, Córdoba (5016), Argentina.

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Biología, Universidad Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil. E-mail: dagarcia@efn.uncor.edu

Introducción

El receptor GABA_A es el principal receptor inhibitorio del sistema nervioso central. Posee diferentes lugares de reconocimiento para la unión de ligandos específicos y moduladores. Estos compuestos son potencialmente útiles en medicina humana como agentes analgésicos, anestésicos, ansiolíticos y anticonvulsivantes. Los moduladores más conocidos son benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides entre otros. Cada uno de estos compuestos se comporta como modulador alostérico de los demás potenciando, en general, su unión al receptor [1]. Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha descrito a diferentes compuestos fenólicos derivados del propofol, un reconocido agente gabaérgico, como moduladores positivos de dicho receptor [2,3,4,5]. En el presente trabajo, se evalúa la citotoxicidad de estos compuestos, incluyendo a propofol como referencia, a concentraciones similares a las que demostraron efectos farmacológicos.

Metodología

Se incluyeron en el presente trabajo cinco compuestos fenólicos: eugenol, timol, propofol y carvacrol y clorotimol. Propofol es un compuesto de síntesis, clorotimol es un monoterpenoide derivado de timol y los demás son componentes importantes de numerosos aceites esenciales. Timol y carvacrol son extraídos de aceites esenciales de numerosas especies de tomillo (género *Thymus*) y de orégano (gen. *Origanum*) respectivamente, mientras eugenol se encuentra en numerosas especies como la albahaca y el clavo de olor (gen. *Ocimum* y *Syzygium*) [6,7].

Se realizaron cultivos primarios de neuronas corticales de embriones de rata (16-18 días de gestación) y se determinaron sus efectos sobre la viabilidad celular a través de la evaluación de la integridad mitocondrial de la célula (reducción de MTT) y de la integridad de la membrana celular (liberación de Lactato Deshidrogenasa –LDH). Los cultivos y ambas técnicas nombradas se realizaron según lo indicado en García et al., (2006) [3]. Brevemente, se disecan las cortezas cerebrales de embriones de ratas de 16-18 días de gestación y tras la digestión con tripsina, se centrifuga y aspira el sobrenadante para luego proceder a la digestión mecánica. Las células obtenidas se resuspenden en medio de cultivo apropiado. Los ensayos se realizan entre los 6-7 días in vitro, cuando estas células expresan el receptor GABA_A funcional.

Para valorar la toxicidad de los compuestos se analizó paralelamente su capacidad de inducir hemólisis en condiciones isotónicas, siguiendo la técnica descrita por Malheiros et al. [8]. La sangre fue suministrada por el banco de sangre del Hemocentro de Campinas. Los eritrocitos fueron obtenidos y diluidos en PBS, pH 7.4, hasta una absorbancia aproximada de 0,9 a 412 nm (hematocrito del 0,15%). Luego, se prepararon las muestras con los correspondientes compuestos fenólicos y se dejó incubar durante 15 minutos a 37°C. Finalmente, después de una centrifugación a 1500 g por 10 min, se midió la concentración de hemoglobina liberada al sobrenadante para calcular el porcentaje de hemólisis (% H) como se describe a continuación:

$$\% H = [(A_S - A_{PBS}) / (A_{H_2O} - A_{PBS})] * 100$$

donde A_S , A_{PBS} y A_{H_2O} corresponden a las absorbancias a 412 nm de la solución de eritrocitos en presencia del compuesto (muestra), resuspendidos en buffer (control) o resuspendidos en agua (100% hemólisis), respectivamente.

Resultados

El análisis de los resultados de los ensayos de citotoxicidad, realizados en neuronas corticales, mostró que ninguno de los compuestos ensayados disminuyó significativamente la viabilidad celular a concentraciones donde los mismos demostraron tener actividad sobre el receptor GABA_A. Esto implica que la presencia de los compuestos fenólicos ensayados, al menos hasta 24 hs posteriores a su incorporación al medio de cultivo, no alterarían la integridad mitocondrial y de la membrana plasmática de las neuronas a concentraciones farmacológicamente activas. Sin embargo, en caso del clorotimol, si bien no demostró un claro efecto sobre la viabilidad neuronal según los ensayos realizados, las células mostraron signos morfológicos de daño a concentraciones mayores a 100 µM.

Los resultados de hemólisis mostraron que ninguno de los productos ensayados indujo la rotura de los eritrocitos como consecuencia de su actividad sobre la membrana de los mismos ya que los porcentajes de hemólisis no fueron significativamente diferentes a la muestra control (eritrocitos en ausencia de los compuestos).

Conclusiones

Los datos obtenidos de los ensayos realizados sugieren la ausencia de citotoxicidad de los compuestos fenólicos estudiados al menos hasta 24 hs de exposición a los mismos y a concentraciones similares a las farmacológicamente activas sobre el receptor GABA_A. A pesar de su alta lipofilicidad y tendencia a particionarse en fases membranosas [9] ningún compuesto mostró capacidad hemolítica.

Referencias

1. Mac Donald and Olsen (1994). *Biochem Pharmacol.* 68,1675
2. Sánchez et al. (2004) *Coll Surf B.* 34, 77
3. García et al. (2006) *Neuropharmacol.* 50, 25
4. García et al. (2008) *Eur J Pharm.* 600, 26
5. Reiner et al. (2010) XXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias.
6. Brand-Williams et al. (1995) *Food Sci Technol.* 28, 25.
7. Ruch et al. (1989) *Carcinogenesis.* 10(6), 1003.
8. Malheiros et al. (1998) *Biochim Biophys Acta* 1373, 332.
9. Reiner et al. (2009) *J Pharm Biomed Anal* 49, 686.

Este trabajo fue financiado por SECyT-UNC, FONCyT, CONICET, MINCyT-Arg y CAPES-Brasil. LDM y GNR comparten la primera autoría de este trabajo.