

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



“EFECTOS DE ISONIACIDA, VIGABATRINA, GABAPENTINA Y
EXTRACTO PENTÁNICO DE *Lepidium meyenii* L. (Maca) SOBRE LOS
NIVELES DE GABA PRODUCIDOS POR NEUROBLASTOMA B35”

Tesis presentada por los Bachilleres:

RONDÓN ORTIZ, ALEJANDRO NICO
VILLANUEVA SARDÓN, RODRIGO JOSÉ

Para optar el Título Profesional de
QUÍMICO FARMACÉUTICO

Asesor: Jaime D. Cárdenas García, PhD.

Arequipa-Perú
2014



RESUMEN

El ácido- γ -aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor inhibitorio, presente principalmente en el sistema nervioso central (SNC) donde juega un rol muy importante en la regulación de la homeostasis cerebral entre excitación e inhibición.

Se prepararon cultivos celulares de neuroblastoma B35, de los cuales se extrajeron muestras conteniendo el GABA producido por los mismos; estas muestras fueron sometidas a un proceso de derivatización pre-columna utilizando o-ftaldialdehído/sulfito (OPA/SO₃⁻²), para ser posteriormente cuantificadas por cromatografía líquida de alta performance con detección electroquímica (HPLC-ED).

Se realizó un ensayo para determinar la producción diaria de GABA y se demostró que el neuroblastoma B35 sintetiza este neurotransmisor durante las primeras 24 horas de incubación, llegando a niveles de 40 ng/mL a las 48 y a concentraciones de 131.14 ± 1.01 ng/mL de GABA a las 96 horas.

Se prepararon cultivos celulares de neuroblastoma B35 incubados junto con vigabatrina (VGT) (0.1, 0.5, 1.0 mM), gabapentina (GB) (0.5, 1.0 mM), isoniacida (INH) (0.5, 1.0 mM) y extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L. (EM) (5, 10, 20 μ g/mL) durante 48 horas, con la finalidad de determinar la influencia de dichos tratamientos sobre los niveles de GABA producidos por esta línea celular. El analito fue posteriormente cuantificado por HPLC-ED evidenciando la disminución en los

niveles de GABA en las muestras incubadas con INH (0.5 y 1.0 mM) y el incremento de los mismos niveles en las muestras incubadas con EM (20 µg/mL). Los resultados de cada ensayo fueron comparados con un grupo control, conteniendo el vehículo utilizado (DM SO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%).

Con la finalidad de disminuir el efecto inhibitorio sobre GABA producido por INH (0.5 mM) esta droga fue administrada en los cultivos celulares de neuroblastoma B35, junto con EM (5, 10 y 20 µg/mL), VGT (1.0 mM) y GB (1.0 mM) para posteriormente ser incubados durante 48 horas. Luego de este periodo el analito fue extraído para ser cuantificado por HPLC-ED. A partir de los resultados se concluyó que GB (1.0 mM) aumenta significativamente los niveles de GABA, por lo tanto se considera que es capaz de atenuar la inhibición producida por INH (0.5 mM).

Se determinó los niveles de GABA en cultivos de neuroblastoma B35, que en primera instancia fueron incubados durante 48 horas sin tratamiento alguno; terminado este periodo, se administró EM (5, 10 y 20 µg/mL), VGT (1.0 mM) y GB (1.0 mM), para luego ser incubados durante 48 horas más. Los resultados obtenidos demostraron que el EM (10 µg/mL) incrementa significativamente los niveles de GABA, contrastados con el control, afirmando que los efectos producidos por este extracto natural actúa sobre células ya desarrolladas.

Para demostrar que las concentraciones de los tratamientos utilizados no modifican el normal desarrollo del neuroblastoma B35, se realizó un ensayo de viabilidad utilizando el compuesto tetrazólico, MTS. No se obtuvo diferencia significativa entre las concentraciones de los tratamientos con el control.



ABSTRACT

The (GABA), γ -aminobutyric acid is an inhibitory neurotransmitter, mainly present in the central nervous system (CNS) which plays an important role in the regulation of brain homeostasis between excitation and inhibition.

B35 neuroblastoma cell cultures were prepared, from which were extracted samples containing the GABA produced, these samples were subjected to a pre-column derivatization process using o-phthalaldehyde/sulfite (OPA/SO₃-2) to be subsequently quantified by high performance liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ED).

An assay was performed to determine the daily production of GABA and it showed that B35 neuroblastoma is able to synthesize this neurotransmitter from the first 24 hours of incubation, reaching levels of 40 ng/mL at 48 hours, and concentrations of 131.14 ± 1.01 ng/mL on the fourth day.

B35 neuroblastoma cell cultures were incubated with vigabatrin (VGT) (0.1, 0.5, 1.0 mM), gabapentin (GB) (0.5, 1.0 mM), isoniazid (INH) (0.5, 1.0 mM) and pentanic extract of *Lepidium meyenii* L. (EM) (5, 10, 20 μ g/mL) for 48 hours, in order to determine the influence of such treatments on GABA levels produced by this cell line. The analyte was then quantified by HPLC-ED evidencing the decreased levels of GABA in the samples incubated with INH (0.5 and 1.0 mM) and increasing

levels in the same samples incubated with EM (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The results of each test were compared with a control group, containing the vehicle used (0.5% DMSO dissolved in 0.9% NaCl).

With the intention of decreasing the inhibitory effect produced by INH (0.5 mM) over the GABA levels. This substance was administered to the neuroblastoma B35 cultures, along with the treatments of VGT (1.0 mM), GB (1.0 mM) and EM (5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); and incubated for 48 hours, to be further quantified by HPLC. The results conclude that GB (1.0 mM) was capable of attenuate the inhibition produced by INH (0.5 mM), increasing significantly the GABA levels on the sample were it was incubated. In other hand, the samples incubated with EM, didn't show any effects in this assay.

It was also determined the GABA levels, working with cells that were, in first instance, incubated by 48 hours, and then were treated by EM (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), VGT (1.0 mM) y GB (1.0 mM), to be incubated for another 48 hours. The results that were obtained after this assay demonstrated that EM (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly increased GABA levels, comparing with the control.

To demonstrate that the concentrations of the treatments used did not alter the normal development of neuroblastoma B35, a viability assay was performed using the tetrazolium compound, MTS. No significant difference between the concentrations of the treatment with the control was obtained.

LISTA DE ABREVIATURAS

GABA :	ácido γ -aminobutírico
Glu:	Glutamato
Gln:	Glutamina.
EM :	Extracto pentánico de <i>Lepidium meyenii</i> L.
GB :	gabapentina
VGT:	vigabatrina
INH:	isoniacida
OPA :	o-phthalaldialdeido
HPLC :	cromatógrafo líquido de alta performance.
HPLC-ED :	cromatógrafo líquido de alta performance con detección electroquímica
SNC :	Sistema Nervioso Central.
GABA _A R :	Receptor gabaérgico tipo A
GABA _B R :	Receptor gabaérgico tipo B
GABA _{rh} R (GABA _C R):	Receptor gabaérgico tipo C
GABA-T:	GABA transaminasa
α -KG:	α -cetoglutarato
GAD:	Glutamato descarboxilasa
GDH:	Glutamato deshidrogenasa
PAG:	glutaminasa (<i>Phosphatase activated glutaminasa</i>)
GS:	glutamine sintetasa
VGAT:	proteína transportadora de GABA vesicular
GAT:	Transportador de GABA
DMEM :	Medio de cultivo <i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>
FBS:	Suero de bovino fetal.

DEDICATORIA

Este reporte de investigación está dedicado de manera especial a **Maribel y Ramón**, a ustedes que con su experiencia y amor pudieron transmitir una enseñanza que ha motivado, y lo sigue haciendo, en mi vida.

Para mis abuelos **Godofredo y Malena**, por su coraje y humildad que marcaron en cada etapa de mi vida.

Para **Emille**, *nunc scio quid sit amor*. Tú que me has motivado y ayudado en mi desarrollo, por enseñarme otras maneras de hacer las cosas, por entrar en mi vida y no querer alejarte de ella. Confía en mi aprendizaje el agradecimiento es infinito.

Para **Diego, Arian, Salvador y Alessia** que con su apoyo y confianza pude realizar toda labor académica en la Universidad.

Para **Belinda, Rosibel, Rossio y Godofredo**, gracias por su apoyo constante e incondicional. Por cada motivación que me brindaron. Por cada momento que invirtieron en mí. Gracias.

Alejandro

DEDICATORIA

Jesús, por permitirme siempre ser más para servir mejor, en especial a quienes más lo necesiten.

Mis papás **José y Yubitza**, por su ejemplo de dedicación y sacrificio, por su amor y motivación continua, por su amistad, pues sin ellos, hoy no sería quien soy y no habría podido llegar tan lejos. Muchas gracias por todo.

Mis hermanos **Gonzalo y Lucia**, mis primos y tíos, quienes con su cariño y apoyo, constante e incondicional, me dieron la confianza para superar toda dificultad que se me presentara. Gracias.

Mis abuelitos **Cesar, Guillermo, Nelly, Dora y Nancy**, porque en sus personas encontré una parte del mejor regalo que Dios me pudo dar, gracias por aconsejarme, cuidarme y darme una razón más para seguir adelante.

Rodrigo

AGRADECIMIENTOS



Los autores quieren agradecer de manera especial al Dr. Timothy Maher, Dr. Mark Bolhke, Dr. Alejandro Pino-Figueroa y Dr. José Villanueva Salas. Con su apoyo y conocimiento brindado por cada uno de ellos, pudimos elaborar el presente trabajo de investigación.

Muchas gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	ix
INDICE DESARROLLADO	x
INDICE DE FIGURAS	xiii
INDICE DE TABLAS	xv
INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	3
OBJETIVOS	4
CAPITULO I. MARCO TEÓRICO	6
CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	39
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIONES.	57
CAPITULO IV. CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	80
REFERENCIAS.	83
ANEXOS.	93

INDICE DESARROLLADO

I. MARCO TEÓRICO	6
1. GABA	6
1.1. Introducción	6
1.2. Síntesis de GABA	7
1.3. Liberación y transporte de GABA	8
1.4. Degradación de GABA	9
1.5. Receptores de GABA	10
1.6. GABA in vitro	12
2. CULTIVOS CELULARES	13
2.1. Introducción	13
2.2. Medio de Cultivo	14
2.3. Ensayos comúnmente utilizados	14
3. NEUROBLASTOMA B35	15
3.1. Introducción	15

3.2. Bioquímica de neuroblastoma B35.....	15
3.3. Modelo farmacológico.....	17
4. DROGAS UTILIZADAS EN ESTA INVESTIGACIÓN	18
4.1. Vigabatrina.....	18
4.2. Gabapentina.....	20
4.3. Isoniacida	22
5. <i>Lepidium meyenii</i> L.....	24
5.1. Introducción.....	24
5.2. Clasificación taxonómica.....	25
5.3. Composición química.....	26
5.4. Macamidas.....	29
5.5. Propiedades farmacológicas y medicinales de la Maca.....	31
6. HPLC.....	33
6.1. Introducción a la cromatografía.....	33
6.2. Retención y difusión de los picos.....	34
6.3. Cromatografía líquida de fase reversa.....	34
6.4. Detectores.....	35
6.5. Detección electroquímica.....	35
6.6. Principio de detección.....	36
6.7. Cromatograma.....	36
6.8. Derivatización.....	37
II. MATERIALES Y METODOS.....	39
1. MATERIALES.....	39
1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	39
1.2. MATERIALES Y REACTIVOS.....	39
1.3. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	40
2. METODOLOGÍA.....	41
2.1. EXTRACTO PENTANICO DE <i>Lepidium meyenii</i> L.....	41
2.2. PREPARACIÓN DE LAS DROGAS UTILIZADAS.....	41
2.3. CULTIVO CELULAR.....	45
2.4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE A LOS TRATAMIENTOS.....	49
2.5. ANALISIS CROMATOGRÁFICO.....	51
2.6. ANALISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.....	53
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
1. CULTIVO CELULAR.....	57
2. ANALISIS CROMATOGRÁFICO.....	58
2.1. Resultados cromatográficos.....	58
2.2. Gráfico de Calibración.....	61

3. PRODUCCIÓN DE GABA	62
3.1. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS EN LOS NIVELES DE GABA	64
3.2. EFECTO DE TRATAMIENTOS SOBRE LA INHIBICIÓN PRODUCIDA POR INH	70
3.3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE CÉLULAS MADURAS	74
4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE CÉLULAS	76
CONCLUSIONES	80
SUGERENCIAS	81



INDICE DE FIGURAS.

<i>Figura I.1. Estructura química de GABA.</i>	6
<i>Figura I.2. Síntesis de GABA por descarboxilación de l-Glu.</i>	7
<i>Figura I.3. Esquema de liberación y transporte de GABA.</i>	9
<i>Figura I.4. Reacción realizada por GABA-T.</i>	10
<i>Figura I.5. Esquema de receptores de GABA.</i>	11
<i>Figura I.6. Neuroblastoma B35.</i>	16
<i>Figura I.7. Estructura química de vigabatrina.</i>	18
<i>Figura I.8. Estructura química de Gabapentina.</i>	20
<i>Figura I.9. Estructura química de Isoniacida.</i>	22
<i>Figura I.10. Maca cosechada con la parte aérea y el hipocotilo fresco.</i>	24
<i>Figura I.11. Hipocotilos de <i>Lepidium meyenii</i> L.</i>	25
<i>Figura I.12. Estructura química de macaridina.</i>	28
<i>Figura I.13. Estructura química de lepidiliin A (izquierda) y lepidilin B (derecha)</i>	28
<i>Figura I.14. Estructura química de MTCA.</i>	29
<i>Figura I.15. Estructura química de macamida 1 (arriba) y macamida 2 (abajo)</i>	30
<i>Figura I.16. Estructura química de anandamida (Endocanabinoide).</i>	30
<i>Figura I.17. Componentes básicos de un equipo HPLC.</i>	34
<i>Figura I.18. HPLC con detección coulométrica electroquímica.</i>	36
<i>Figura I.19. Derivatización pre-columna del derivado electroactivo sulfonato, a partir de GABA, OPA y SO_3^{2-}</i>	37
<i>Figura II.1. Cámara de flujo laminar (Esco®, Class II Type A2)</i>	40
<i>Figura II.2. Frasco de incubación</i>	45
<i>Figura II.3. Neuroblastoma B35 en well plates previo a administración de tratamientos.</i>	47
<i>Figura II.4. Well plates con muestra, rotuladas para su cultivo.</i>	50
<i>Figura II.5. Reacción del ensayo MTS.</i>	51
<i>Figura II.6. Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC, ESA®, Coulomchem II) con autosampler (ESA®, Model 542).</i>	51
<i>Figura III.1. Neuroblastoma B35 visto en microscopio invertido.</i>	57
<i>III.2. Derivado sulfonato de GABA con OPA/SO_3^{2-}</i>	58
<i>Figura III.3. Cromatograma del análisis completo de muestra, tiempo: 50 minutos</i>	59
<i>III.4. Efecto de pH en la separación de GABA.</i>	60
<i>Figura III.5. Cromatograma de GABA con estándar (60 ng/mL).</i>	60
<i>Figura III.6. Cromatogramas de los estándares de GABA usados en la curva de calibración.</i>	61
<i>Figura III.7. Curva de calibración de GABA con derivatización OPA/SO_3^{2-}.</i>	62
<i>Figura III.8. Producción de GABA por día.</i>	63
<i>Figura III.9. Influencia de los tratamientos sobre los niveles de GABA producidos por Neuroblastoma B35.</i>	66

<i>Figura III.10. Influencia de EM sobre los niveles de GABA producidos por Neuroblastoma B35.</i>	69
<i>Figura III.11. Efecto de los tratamientos sobre la inhibición de GAD producido por INH (0.5 mM)</i>	72
<i>Figura III.12. Efecto de los tratamientos sobre los niveles de GABA producidos por células maduras.</i>	75
<i>Figura III.13. Efecto de los tratamientos sobre la viabilidad del neuroblastoma B35.</i>	77



INDICE DE TABLAS.

<i>Tabla I.1. Compuestos que actúan sobre los receptores de GABA.</i>	12
<i>Tabla I.2. Bioquímica de Neuroblastoma B35.</i>	16
<i>Tabla I.3. División taxonómica de <i>Lepidium meyenii</i> L.</i>	25
<i>Tabla I.4. Composición de aminoácidos en <i>Lepidium meyenii</i> L.</i>	26
<i>Tabla I.5. Propiedades de la maca después de la administración in vivo en una serie de modelos farmacológicos.</i>	31
<i>Tabla II.1. Soluciones de vigabatrina.</i>	42
<i>Tabla II.2. Soluciones de gabapentina.</i>	43
<i>Tabla II.3. Soluciones de isoniacida.</i>	44
<i>Tabla II.4. Soluciones de extracto pentánico de <i>Lepidium meyenii</i> L.</i>	44
<i>Tabla II.5. Composición de cada pozo de incubación.</i>	47
<i>Tabla II.6. Fórmulas para ANOVA.</i>	53
<i>Tabla III.1. Concentraciones de estándares de GABA</i>	61
<i>Tabla III.2. Producción de GABA (ng/mL) por día.</i>	63
<i>Tabla III.3. Influencia de los tratamientos en los niveles de GABA (ng/mL) a las 48 horas de incubación.</i>	64
<i>Tabla III.4. ANOVA de la influencia de los tratamientos en los niveles de GABA</i>	65
<i>Tabla III.5. Test post hoc de Dunnet de la influencia de los tratamientos sobre los niveles de GABA</i>	65
<i>Tabla III.6. Influencia del extracto pentánico de <i>Lepidium meyenii</i> L. Sobre los niveles de GABA (ng/mL) a las 48 horas de incubación.</i>	67
<i>Tabla III.7. ANOVA de Influencia de EM sobre los niveles de GABA.</i>	68
<i>Tabla III.8. Test post hoc de Dunnet de la influencia de EM sobre los niveles de GABA</i>	68
<i>Tabla III.9. Influencia de los tratamientos en la inhibición de Isoniacida (0.5 mM) sobre los niveles de GABA (ng/mL) a las 48 horas.</i>	71
<i>Tabla III.10. ANOVA del efecto de los tratamientos sobre la inhibición producida por INH (0.5 mM)</i>	71
<i>Tabla III.11. Test post hoc de Dunnet del efecto de los tratamientos sobre la inhibición producida por INH (0.5 mM)</i>	72
<i>Tabla III.12. Influencia de los tratamientos en la células maduras sobre los niveles de GABA (ng/mL)</i>	74
<i>Tabla III.13. ANOVA de los efectos de los tratamientos sobre células maduras.</i>	74
<i>Tabla III.14. Test post hoc de Dunnet de los efectos de los tratamientos sobre células maduras.</i>	75
<i>Tabla III.15. Porcentaje de la viabilidad de INH, VGT, EM y GB</i>	77
<i>Tabla III.16. ANOVA de los tratamientos sobre la viabilidad del neuroblastoma B35.</i>	78
<i>Tabla III.17. Test post hoc de Dunnet de los tratamientos sobre la viabilidad del neuroblastoma B35.</i>	78

INTRODUCCIÓN.

El ácido- γ -amino butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso central (SNC). Este neurotransmisor juega un rol importante en la homeostasis cerebral entre la excitación e inhibición [1]. GABA es sintetizado, en neuronas y glías, por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) utilizando l-glutamato como precursor, una vez producido GABA es almacenado en vesículas y esta labor la cumple la enzima VGAT (proteína transportadora de GABA vesicular) el metabolismo de esta sustancia está a cargo de la enzima GABA-T [2].

El GABA que no es metabolizado interactúa con receptores post-sinápticos en el SNC, hasta ahora se han descubierto 3 tipos de receptores, de los cuales dos de ellos son ionotrópicos y uno es metabotrópico. Los receptores ionotrópicos que se encuentran en neuronas post-sinápticas (GABA_A y GABA_C) actúan a través de canales iónicos ya que poseen un canal permeable para el ion Cl⁻; por otro lado, el receptor metabotrópico, es un receptor acoplado a proteínas G y se le denomina receptor GABA_B a este se le encuentra en la neurona pre-sináptica y post-sináptica. [2, 3]. A todo el proceso relacionado con GABA se le denomina sistema GABAérgico, se debe recalcar que este sistema es un blanco terapéutico para diversas drogas y estas tratan diversas condiciones médicas como: trastornos de ansiedad, desordenes de aprendizaje, alteraciones de memoria y la más representativa epilepsia. Sin embargo, otras enfermedades se han asociado a alteraciones en la función de GABA como dependencia a drogas (alcoholismo), desordenes sensorio-motores, además de esquizofrenia, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson [1].

El cultivo celular de neuroblastoma B35, es un modelo in vitro utilizado en la actualidad para la investigación en neurociencia, y es preferido en comparación a otros por poseer ciertas características neuronales como excitabilidad de membrana y enzimas del metabolismo de neurotransmisores [4, 5]. Esta célula expresa acetilcolinesterasa (AChE), tirosina Hidroxilasa (TH) y GAD [6], lo que denota la capacidad del neuroblastoma B35 para producir GABA.

Ciertas drogas que actúan en el sistema GABAérgico se utilizaron en esta investigación con la finalidad de alterar los niveles de GABA producidos por el

neuroblastoma B35 y estos después fueran cuantificados por HPLC-ED. Estas drogas fueron vigabatrina, gabapentina, isoniacida y un extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L.

Vigabatrina es una droga utilizada para atenuar convulsiones parciales, su mecanismo de acción consiste en la inhibición de GABA-T lo que conlleva a un aumento en los niveles de GABA en el SNC [7]. Gabapentina es utilizada también en convulsiones parciales, su mecanismo de acción no es claro [8]. Esta droga ha demostrado ser efectiva en una amplia gama de modelos experimentales in vivo [9, 10]. Además, ha demostrado ser una droga que carece de interacciones medicamentosas, y que aumenta los niveles de GABA en pacientes con epilepsia, pese a que no se ha encontrado relación alguna con la enzima GAD [8], pero gabapentina es capaz de inhibir en un 33% la GABA-T [11]. La isoniacida es una droga utilizada en la terapia para la tuberculosis; sin embargo, esta ha demostrado, que a dosis elevadas, produce convulsiones en animales de experimentación [12]. El mecanismo de inducción de convulsiones es debido a la inhibición de la enzima GAD [13, 14].

Lepidium meyenii L. (Maca) es una planta peruana que se desarrolla alrededor de 4000 m.s.n.m. y que es ampliamente consumida en Perú debido a sus propiedades nutricionales y efectos farmacológicos; sobre todo por la influencia sobre la conducta sexual [15]. El perfil farmacológico de la maca ha demostrado poseer diversas actividades farmacológicas como la de regular hormonas, incrementar la fertilidad en ratas hembras y machos, desarrollar un efecto adaptogénico y anti estrés; además, se ha demostrado la capacidad de actuar sobre el SNC, ya que es capaz de mejorar la memoria y aprendizaje en ratas, además de actuar como neuroprotector por inhibición de la enzima FAAH (*Fatty acids amide hydrolase*), esta enzima actúan en el sistema endocanabinoide [15, 16, 17]. Además, en la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María, se ha demostrado la actividad anticonvulsivante del extracto pentánico *Lepidium meyenii* L. en ensayos in vitro con convulsiones inducidas por pilocarpina [18].



HIPÓTESIS.

Dado que los niveles de GABA producidos por el neuroblastoma B35 pueden ser modificados por INH, GB, VGT y EM, es posible que esta línea celular pueda ser considerada como un modelo *in vitro* para ensayos sobre el sistema GABAérgico.

OBJETIVOS.

1. Demostrar la capacidad de la línea celular neuroblastoma B35 para producir GABA.
2. Cuantificar los niveles de GABA producidos diariamente por el neuroblastoma B35 por cromatografía líquida de alta performance con detección electroquímica (HPLC-ED).
3. Comprobar los efectos de isoniacida, vigabatrina, gabapentina y el extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L. sobre la síntesis y metabolismo de GABA producidos por neuroblastoma B35.
4. Determinar si las concentraciones de isoniacida, vigabatrina, gabapentina y el extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L. afectan el normal desarrollo de neuroblastoma B35.



I. MARCO TEÓRICO

1. GABA

1.1. Introducción

El ácido γ -aminobutírico (GABA) (figura I.1) es el neurotransmisor inhibitorio más importante en el Sistema Nervioso Central de los mamíferos. Fue descubierto por Roberts y Awapara en estudios electrofisiológicos entre 1950 y 1965 [1]. Desde entonces GABA ha sido clasificado como neurotransmisor porque satisface los siguientes criterios: se encuentra presente en terminales nerviosas, se sintetiza en la neurona, se almacena en sistemas de vesículas y es transportado hacia las terminales nerviosas, es liberado debido a estímulo y una vez en el espacio sináptico interacciona con un receptor, desencadenando una acción determinada. Esto conlleva al proceso de recaptación o metabolismo del compuesto.

Se debe considerar también que GABA cumple con el criterio de la administración exógena de otra sustancia que se sospecha va a mimetizar el efecto producido por la sustancia neurotransmisora [2].

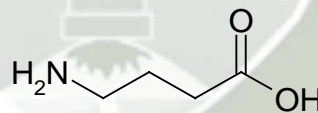


Figura I.1. Estructura química de GABA.

Cabe mencionar que se ha encontrado GABA y sus receptores en tejidos periféricos como en el hígado, bazo, ganglios y en el nervio esplénico. Los niveles de GABA en estos tejidos son muy bajos y su investigación está en proceso [2]. Sin embargo, los niveles de GABA en el SNC son muy altos (milimoles por gramo de tejido) comparados con las monoaminas, que son clásicos neurotransmisores (nanomoles por gramo de tejido) [2].

El sistema GABAérgico es muy importante en la homeostasis cerebral, ya que alteraciones a este nivel desencadenan trastornos y enfermedades,

tales como la epilepsia, la cual es un desbalance entre excitación e inhibición cerebral, produciendo convulsiones. Se ha asociado GABA a otros desordenes como dependencia a drogas (alcoholismo), desordenes sensorio-motores, incluyendo desordenes de aprendizaje y memoria, además de esquizofrenia, enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson [1].

Por esta razón, es que el sistema GABAérgico ha sido considerado como un blanco terapéutico para una amplia gama de drogas activas sobre el SNC, incluyendo ansiolíticos, hipnóticos, anestésicos generales, y anticonvulsivantes [3].

1.2. Síntesis de GABA.

Este neurotransmisor es producido por descarboxilación del aminoácido L-Glu (L-glutamato) por acción de la enzima GAD (glutamato descarboxilasa) [1-3] (figura I.2). L-Glu además de ser precursor de GABA, también es el neurotransmisor excitatorio más importante del SNC. L-Glu controla la síntesis de GABA al activar GAD junto al cofactor enzimático piridoxalfosfato [19].

GAD (E.C. 4.1.1.15) es la enzima encargada de la producción de GABA y posee dos isoformas: estas difieren por sus pesos moleculares (67 Kda y 65 Kda). Son expresadas por diferentes genes y están localizadas en diferentes lugares intracelulares; además poseen diferentes funciones, propiedades e interacciones con cofactores [2, 20].

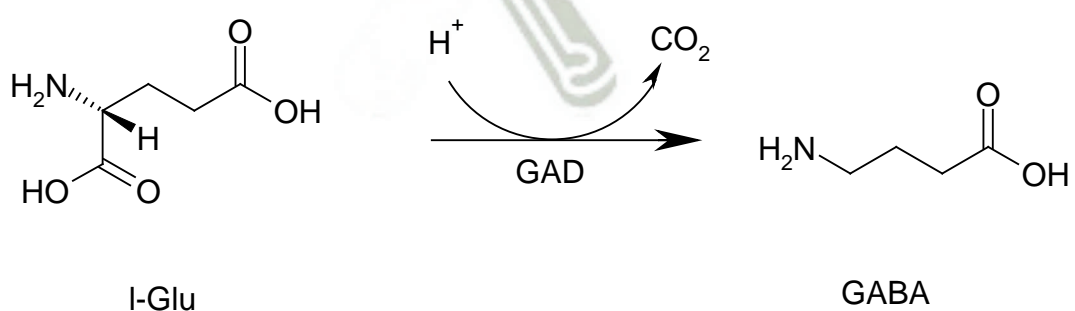


Figura I.2. Síntesis de GABA por descarboxilación de L-Glu.

GAD65 está concentrada en los terminales nerviosos para cumplir la función de neurotransmisión, y tiene más afinidad por el cofactor piridoxal fosfato. Además, hay una asociación funcional entre GAD65 y VGAT (Proteína transportadora de GABA Vesicular); por lo tanto, GAD65 tiene una función que aporta a la neurotransmisión de GABA. Por otro lado, GAD67 está localizado en todo el espacio citoplasmático y GABA producido por esta isoforma posee funciones de factor trófico para la sinaptogénesis durante el desarrollo temprano, protege después de un daño neuronal, es fuente de energía y regulador del potencial redox durante el estrés oxidativo [20].

1.3. Liberación y transporte de GABA.

GABA es almacenado en vesículas presinápticas después de su síntesis y VGAT (proteína transportadora específica vesicular) es la proteína encargada de cumplir esta función. Esta proteína es selectiva para neurotransmisores aminoacídicos inhibitorios, tales como GABA y glicina, y actúa por acción de una bomba de protones ($ATPase H^+$). La liberación de GABA de estas vesículas es producida por exocitosis ocasionada por despolarización por acción de Ca^{+2} [21, 22].

En la Figura I.3. Se evidencia el sistema que posee GABA, desde su síntesis, liberación hacia el espacio sináptico por parte de VGAT, pero no todo el GABA liberado interacciona con sus receptores. El GABA remanente es recaptado por medio de unas proteínas transportadoras denominadas GAT (transportadores de GABA), se han descubierto tres tipos de estas proteínas GAT1, GAT2 y GAT3; de estos, GAT1 es encontrado en neuronas presinápticas GABAérgicas, GAT3 localizado en astrocitos, y GAT2 es una proteína encontrada en otros órganos ajenos al cerebro [22].

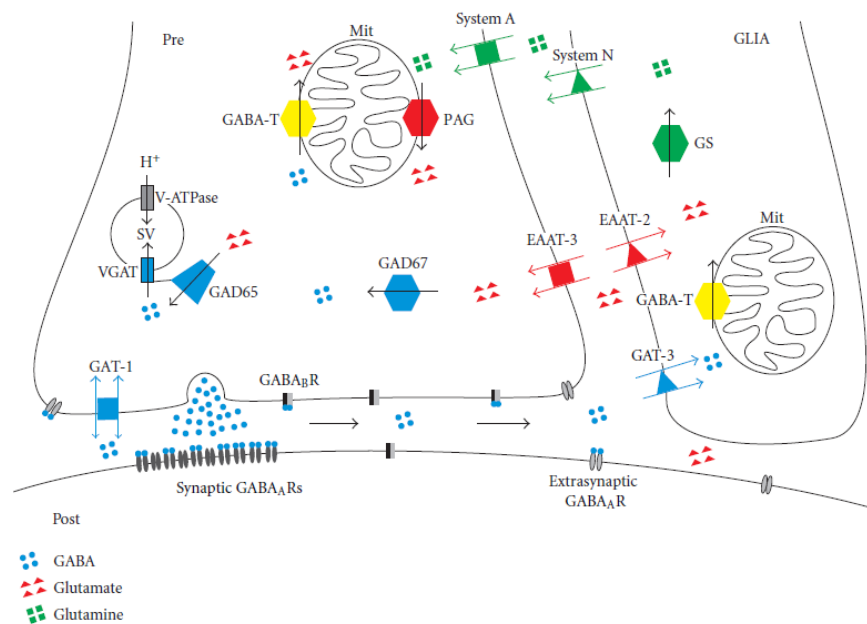


Figura I.3. Esquema de liberación y transporte de GABA.

Fuente: *GABA Metabolism and Transport: Effects on Synaptic Efficacy*. [22]

GAT1 es el transportador de GABA más estudiado y se expresa en casi todo el cerebro; además, que es considerado un blanco terapéutico para el anticonvulsivante tiagabina, droga utilizada en el tratamiento de las convulsiones parciales, cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir transportador. [21, 23].

1.4. Degradación de GABA.

La mitocondrias de las neuronas y los astrocitos poseen GABA-T (GABA transaminasa) enzima importante en la degradación de GABA, la cual convierte GABA y α -cetoglutarato (α -KG) hasta semialdehído succínico (SSA) y glutamato [21]. Esta reacción esta expresada en la figura I.4.

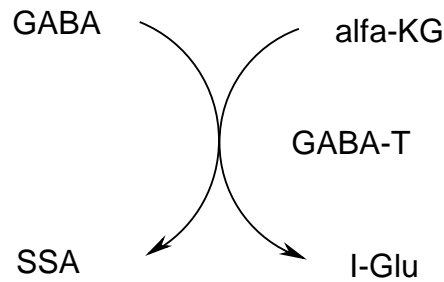


Figura I.4. Reacción realizada por GABA-T.

Ahora, se debe considerar que este proceso conduce a la generación de nuevas moléculas de GABA, ya que el glutamato formado puede llegar a ser descarboxilado por GAD para formar GABA y el SSA entra al ciclo de Krebs, y en este sistema va a dar como producto α -cetoglutarato y este va a convertirse en glutamato por acción de la enzima GDH (Glutamato deshidrogenasa). Todo este proceso está bajo la influencia de las concentraciones de los productos [21, 22, 24].

1.5. Receptores de GABA.

El sistema GABAérgico posee tres familias de receptores, de los cuales dos son ionotrópicos, es decir actúan a través de canales iónicos tales como $GABA_A$ R y $GABA_{A-\rho}$ R (este último llamado a veces $GABA_C$ R) y el último es un receptor metabotrópico, esto quiere decir que es un receptor asociado a proteínas G ($GABA_B$ R).

Los receptores ionotrópicos de GABA son pentaméricos, poseen cinco subunidades, se ha clasificado a las subunidades con letras griegas, las cuales tenemos α , β , γ , δ , ϵ , π , ρ y θ . Algunos investigadores sostienen que la subunidad ρ (rho) solo es encontrada en los receptores $GABA_{A-\rho}$ R ($GABA_C$ R). Cada subunidad está compuesto por 1 proteína transmembrana que atraviesa la membrana 4 veces (4 dominios) y también se ha identificado que cada subunidad está clasificada en isoformas, con ello tenemos 6α , 3β , 3γ y 3ρ ; por ejemplo, en un receptor $GABA_A$ R se pudo identificar 4 subunidades α (α_1 , α_2 , α_3 y α_5) y una subunidad γ_2 , con esta información se han encontrado receptores con 17 combinaciones distintas

[2]. Es importante considerar que la localización de estos receptores es muy diverso. Por ejemplo, $GABA_A$ R se encuentra disponible en la neurona postsináptica de casi todo el cerebro y otros órganos, es el receptor más estudiado de este sistema, a este nivel actúan anticonvulsivantes, ansiolíticos, anestésicos, etc. $GABA_C$ R es hallado en neuronas postsinápticas en la retina, con niveles significantes en la médula espinal y glandula pituitaria. Este receptor aún está en proceso de investigación. $GABA_B$ R es localizado en la neurona presináptica, y este es actualmente investigado como futuro blanco terapéutico, ya que un knockout en ratones de este receptor ha manifestado convulsiones epileptiformes, hiperalgesia, hiperlocomoción, y empeoramiento de la memoria [2, 25]. En la Figura I.5. Muestra la disposición de los receptores de $GABA$.

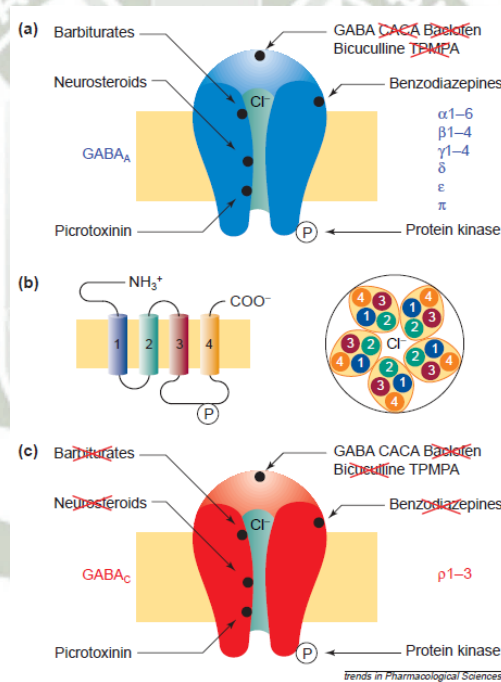


Figura I.5. Esquema de receptores de $GABA$.

Los receptores $GABA_A$ y $GABA_C$ se encuentran en (a) y (c), con algunos compuestos que actúan como agonistas. En (b) encontramos la disposición de la subunidad con sus dominios a través de la membrana.

Fuente: *The 'ABC' of GABA receptors*. [26]

1.6. GABA *in vitro*.

Una vez que GABA fue encontrado en extractos cerebrales, se determinaron sus propiedades, sus roles, los efectos que ejercía sobre SNC y sobre todo su ruta metabólica [1]. Muchos de los estudios fueron conducidos por grupos de investigadores que consideraron técnicas para la determinación de este neurotransmisor, tales como cromatográficas, con isotopos radioactivos ([H3]-GABA), espectrofotométricos, electrofisiológicos, etc. [27].

Sin embargo, muchas de las pruebas realizadas fueron ensayos *in vitro*, que fueron útiles para determinar qué células son capaces de producir GABA; es decir, aquellas que expresan GAD. Con esta información se pudo determinar que hay neuronas que producen más GABA que otras, denominadas "Neuronas GABAérgicas". Además es importante mencionar que estas están asociadas con procesos inhibitorios en el cerebro [2].

Por otro lado, un grupo de muestras fueron extraídas de cerebros de roedores, aislando zonas específicas, con la finalidad de determinar otros procesos relacionados con esta sustancia, como una superproducción de GABA por ciertas neuronas del cerebelo y cerebro [28, 29]. Finalmente, muchas drogas fueron probadas en ensayos *in vitro* determinando su acción sobre la inducción o inhibición en la producción, metabolismo o transporte de este neurotransmisor, o sobre sus receptores [1, 2].

En la siguiente tabla se muestran algunas sustancias que reaccionan con los receptores de GABA, como agonistas o antagonistas.

Tabla I.1 Compuestos que actúan sobre los receptores de GABA.

COMPUESTO	GABA _A R	GABA _B R	GABA _C R
GABA	Agonista	Agonista	Agonista
Muscimol	Agonista	INACTIVO	Agonista Parcial
Isoguvacine	Agonista	INACTIVO	Antagonista
THIP	Agonista	INACTIVO	Antagonista

P4S	Agonista	INACTIVO	Antagonista
TACA	Agonista	INACTIVO	Agonista
CACA	INACTIVO	INACTIVO	Agonista Parcial
(R)-Baclofeno	INACTIVO	Agonista	INACTIVO
Bicuculina	Antagonista	INACTIVO	INACTIVO
Picrotoxina	Antagonista	INACTIVO	Antagonista
CGP 35348	INACTIVO	Antagonista	INACTIVO
CGP 54626	INACTIVO	Antagonista	INACTIVO
CGP 64213	INACTIVO	Antagonista	INACTIVO
SCH 50911	INACTIVO	Antagonista	INACTIVO
TPMPA	INACTIVO	INACTIVO	Antagonista

Fuente: *GABA receptors* [25]

2. CULTIVOS CELULARES

2.1. Introducción

Este es un método de experimentación que viene siendo utilizado por la investigación ya desde hace muchos años. Las técnicas de cultivo celular han permitido el estudio de la fisiología neuronal, de muchos desórdenes neuronales, además de la dilucidación del mecanismo de acción de nuevas drogas.

Los modelos *in vivo* tienden a complicarse cuando no se pueden controlar factores como la variabilidad biológica o los cambios cerebrovasculares que pueden afectar la evaluación de la eficacia farmacológica. En cambio utilizando modelos *in vitro*, se tiene la ventaja, de un mayor control sobre los factores que puedan afectar el daño neuronal o los posibles mecanismos de acción de los agentes farmacológicos a utilizar.

El uso de células de neuroblastoma de humano SH-SY5Y [30] y de rata B35 [4] entre otros tipos de células, han permitido el diseño de métodos

eficaces para la investigación de drogas y la consecuente identificación de agentes que pudiesen causar variaciones en los niveles de los neurotransmisores de dichas células.

2.2. Medio de Cultivo

Para mantener estas células se deben cultivar en Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés *Dulbecco's modified eagle médium*), suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés *Fetal Bovine Serum*) (v/v) y una solución de penicilina-estreptomina al 1% (v/v). Siendo incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. [31]

Pueden ser sembradas entre aproximadamente 1000 a 1000000 células por pozo en platos de 96 pozos, y crecer hasta un 75-80% de confluencia por pozo. En este estado, las células, pueden ser expuestas a diferentes tipos de agentes nocivos para imitar los mecanismos de acción de lesiones que se creen, ocurren in vivo.

Entre estos agentes nocivos se encuentra, el peróxido de hidrógeno que permite imitar los efectos del estrés oxidativo que se produce en las células [30,32].

2.3. Ensayos comúnmente utilizados

La viabilidad celular es uno de los indicadores indirectos de daño celular, de tal manera que es necesario hacer pruebas preliminares para evidenciar que las drogas a utilizar en los cultivos no produzcan daño celular tal que pueda ser confundido con alguna conclusión del experimento que vaya a realizarse.

Esta puede ser determinada mediante varios métodos: microscopía directa para determinar cambios morfológicos como la forma (esférica o dendrítica) o la longitud de las dendritas; exclusión por tinción, es otro procedimiento microscópico para evaluar el número de células viables y no

viables, siendo contadas en un hemacitómetro y estimando la viabilidad celular al medir los cambios en la absorbancia o fluorescencia después del tratamiento de las células con reactivos que pueden ser modificados por procesos metabólicos normales en las mismas [31]. En la sección de materiales y métodos se ahondará en los detalles de estos procesos in vitro.

3. NEUROBLASTOMA B35.

3.1. Introducción.

En 1974 Schubert y colaboradores afirmaron lo difícil que es trabajar con neuronas del Sistema Nervioso Central, ya que ensayar en estas muestras demanda muchos retos, es por eso que clonaron múltiples líneas celulares (tanto neuronales como gliales). Estas fueron producto de la inducción de tumoraciones en ratas neonatales BDIX con nistrosoetilurea [6]. De las 14 líneas celulares clonadas, actualmente solo 2 son consideradas para ensayos en cultivos celulares el neuroblastoma B35 y neuroblastoma B50 [4]. El neuroblastoma B35 (figura I.6) posee características muy similares a la neurona de rata, como excitabilidad de membrana, enzimas para el metabolismo de neurotransmisores: además, neuroblastoma B35 expresa niveles normales de enolasa específica neuronal, el cual es una enzima importante en el proceso de la Glicolisis [5].

3.2. Bioquímica de neuroblastoma B35.

Esta línea celular es capaz de producir Acido γ -aminobutírico (GABA), debido a la capacidad de expresar la enzima GAD [1]. Además expresa acetilcolinesterasa (AChE) que es la enzima encargada de hidrolizar el neurotransmisor ACh (Acetil Colina) en colina y acetato [6]. Algunas de las características serán presentadas en la Tabla I.2.

Neuroblastoma B35 posee cualidades interesantes, como son expresadas en la tabla anterior. Además, produce colágeno es por esto que esta célula se

adhiera a la superficie de los well plates cuando su desarrollo está en proceso [4]. Es importante mencionar que se ha usado esta línea celular como un modelo de descubrimiento de rutas de señalización intracelular [34].

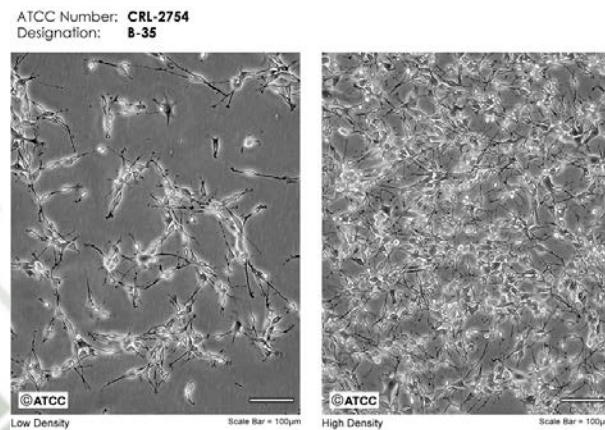


Figura I.6. Neuroblastoma B35.

Después de 2 días de desarrollo (izquierda, baja densidad), después de 4 días de desarrollo (derecha, alta densidad).

Fuente: ATCC®.[33]

Tabla I.2. Bioquímica de Neuroblastoma B35.

Propiedades Bioquímicas.	Descripción.
Excitabilidad de membrana	Presente
α -Neurotoxina	Sustancia que indica excitabilidad de membrana.
O-Serum	Indicador positivo: puede cambiar la morfología del Neuroblastoma.
Dibutiril AMP cíclico	Indicador positivo: puede cambiar la morfología del Neuroblastoma.
Acetil Colina (ACh)	40 pmol ($^{14}\text{CO}_2$ liberado)·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (proteína libre)
Tirosina Hidroxilasa (TH)	<2 pmol ($^{14}\text{CO}_2$ liberado)·20 min ⁻¹ ·mg ⁻¹ (proteína libre)
Glutamato Descarboxilasa	330 pmol ($^{14}\text{CO}_2$ liberado)·20 min ⁻¹

(GAD)	$\cdot \text{m g}^{-1}$ (proteína libre)
Acido γ -aminobutírico (GABA)	7.1 residuos \cdot 1000 residuos de aminoácidos libres.
Acetil Colinesterasa (AChE)	100 pmol \cdot min ⁻¹ \cdot m g ⁻¹ (proteína libre)
Butiril Colinesterasa (BChE)	60 pmol \cdot min ⁻¹ \cdot m g ⁻¹ (proteína libre)
S100 (Proteína específica)	< 5 ng \cdot 100 ng ⁻¹ (proteína soluble)
14-3-2 (Proteína específica)	520 ng \cdot 100 ng ⁻¹ (proteína soluble)

Fuente: *Clonal cell lines from the rat central nervous system*. [6]

3.3. Modelo farmacológico.

Neuroblastoma B35 fue blanco de pruebas Ligando-Receptor, en donde se determinó la carencia de afinidad de [3H-] muscimol, el cual es un agonista del receptor de GABA_A, a pesar que se había reportado afinidad de GABA por la superficie de esta línea celular [35]. Esto se corroboró cuando se determinó la capacidad de expresar mRNA para subunidades de GABA_AR por parte de neuroblastoma B35, se halló que en 30 ciclos de amplificación subunidades $\alpha 1$ y $\beta 2$; después de 40 ciclos de amplificación $\alpha 1, 2$; $\beta 2$; $\gamma 1, 2$. A pesar de poseer la capacidad de generar subunidades de GABA_AR, se determinó que esta línea celular no posee un canal de Cl⁻ funcional [36].

Es importante considerar que actualmente se quiere conocer en su totalidad la ruta metabólica de GABA, con todos los elementos que intervienen en el proceso, entonces neuroblastoma B35 posee GAD, la presencia de GABA-T no está reportada, y es importante determinar si PAG (Glutaminasa), enzima que convierte glutamina a glutamato está presente en esta línea celular. Es por eso que se propone a neuroblastoma B35 como un modelo farmacológico en búsqueda de drogas que actúan (induciendo/inhibiendo) sobre el sistema GABAérgico.

4. DROGAS UTILIZADAS EN ESTA INVESTIGACIÓN

4.1. Vigabatrina

4.1.1. Introducción y mecanismo de acción

La vigabatrina (ácido-4-aminohex-5-enoico) (figura I.7) es un agente neuromodulador, sintetizado en el año 1974 [7], diseñado para ser estructuralmente idéntico a GABA excepto por la adición de un grupo vinilo (Figura I.7.). A diferencia de otros fármacos relacionados con el sistema nervioso central (SNC) que han sido descubiertos por *serendipity* [37, 38], la vigabatrina fue sintetizada con la intención de tener un efecto preciso sobre la química en el cerebro. Específicamente, fue diseñada para ser un inhibidor suicida selectivo de la GABA-T, irreversible y activado por la enzima [39, 40]

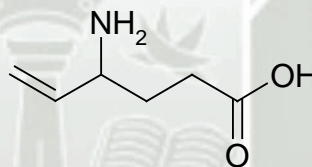


Figura I.7. Estructura química de vigabatrina.

El efecto de la vigabatrina es la inhibición del catabolismo de GABA mediado por GABA-T, conllevando al incremento de GABA disponible en el espacio sináptico, lo cual resulta en una mejoría de la transmisión GABAérgica [7, 41]. Aunque se han encontrado evidencias que sugerirían otros posibles mecanismos de acción para la vigabatrina; estos no han sido replicados por lo que la inhibición de la GABA-T es todavía considerada la principal función de la vigabatrina.

4.1.2. Cinética en el SNC

La farmacocinética de la vigabatrina en el líquido céfalo raquídeo (LCR), fue evaluada en pacientes con epilepsia que recibieron 50 mg vigabatrina diariamente [42]. En estos pacientes, la concentración de vigabatrina en el LCR fue de aproximadamente 10% de lo observado en el plasma. Las mayores concentraciones en el LCR se obtuvieron después de 6 horas con una sola dosis, quedando solo trazas después de 24 horas y ya sin ser detectada después de las 72 horas.

4.1.3. Actividad en el SNC

La vigabatrina ha mostrado, como se predijo, que su acción incrementa los niveles de GABA en el cerebro. Esto fue demostrado por primera vez en un estudio en ratones en el cual la disminución de la actividad de la GABA-T, resultó en un incremento de 5 veces la concentración de GABA en todo el cerebro, cuatro horas después de una inyección de vigabatrina de 1500 mg/kg [7].

Y aun teniendo en cuenta la farmacocinética rápida de la vigabatrina en el plasma, el incremento de GABA en el SNC persistió mucho más, teniendo que medir el tiempo de vida media de la droga en días y no en horas. Este tiempo se correlaciona con el tiempo de recuperación observado de GABA-T (5 días) después de su eliminación [7], confirmando las evidencias del rol de la vigabatrina como inhibidor de la GABA-T.

4.1.4. Usos experimentales

Debido a su mecanismo de acción sumamente específico, se considera una herramienta muy útil para examinar los efectos de GABA en el cerebro.

4.2. Gabapentina.

4.2.1. Introducción

La gabapentina (ácido-2-[1-(aminometil)ciclohexil]acético) (figura I.8) es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de epilepsia, fue originalmente diseñado como un anticonvulsivante GABA mimético, capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. A pesar de que sus efectos anticonvulsivos dentro del SNC han sido bien documentados, preclínica y clínicamente, estos efectos no parecen ser mediados mediante su interacción con los receptores de GABA. La gabapentina es comúnmente utilizada como un tratamiento adicional a la terapia para pacientes con convulsiones parciales, que son resistentes a las terapias convencionales, además también es usado en muchos países para tratar el dolor neuropático [8].

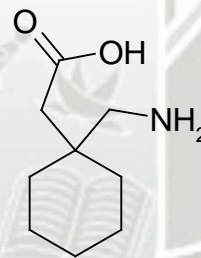


Figura I.8. Estructura química de Gabapentina.

El amplio rango de indicaciones terapéuticas de la gabapentina y su perfil de seguridad remarcable han motivado un gran esfuerzo en la búsqueda de su mecanismo de acción, que continúa siendo sujeto de mucha especulación.

4.2.2. Efecto de la gabapentina en modelos animales: Convulsiones

La gabapentina (Figura I.8.) ha demostrado ser efectiva en un amplio número de modelos de convulsión animal, suscitados ya sea por medios físicos (por ejemplo, electroshock o audiogénico) o

también por medios químicos (por ejemplo, pentilentetrazol, isoniazida, bicuculina, picrotoxina) [9,10]

A partir del perfil mostrado en los modelos animales, se podría esperar que la gabapentina funcionara clínicamente sobre las convulsiones complejas parciales y secundarias generalizadas; siendo especialmente efectiva sobre las parciales y las convulsiones tónico-clónicas.

4.2.3. Eficacia clínica de la gabapentina en epilepsia

La gabapentina está permitida como una terapia adicional al tratamiento de convulsiones parciales con o sin generalización. Su eficacia clínica como anticonvulsivante está probada y extensamente revisada [43, 44]. En general es bien tolerada, siendo una de sus principales ventajas, la ausencia de interacciones medicamentosas, debido a su pobre acoplamiento a proteínas plasmáticas y la falta de metabolismo hepático [45]

4.2.4. Efectos de la gabapentina en el sistema GABAérgico

Como droga, la gabapentina fue originalmente diseñada como una estructura análoga del neurotransmisor inhibitor GABA. Sin embargo, los estudios iniciales sugirieron que la gabapentina no se unía a los receptores GABAA o GABAB [46], ni tampoco era convertida metabólicamente a GABA [47].

In vitro y en altas concentraciones, la gabapentina es un inhibidor mixto de la GABA-T [19] e incrementa la actividad de la glutamato descarboxilasa parcialmente purificada [49]. Desde la aparición de los estudios de espectroscopia de resonancia magnética nuclear in vivo, se ha demostrado que las concentraciones de GABA son elevadas en los pacientes que toman gabapentina, y que esta elevación de GABA está directamente relacionada con el control de las convulsiones [50].

4.3. Isoniacida

4.3.1. Introducción

La isoniacida (piridina-4-carbohidrazida) (figura I.9) es un fármaco efectivo, ampliamente utilizado en la terapia de la tuberculosis. Muy pocos pacientes que reciben isoniacida experimentan efectos adversos neurológicos, incluyendo neuritis periférica, mareos o insomnio. Altas dosis de isoniacida causan convulsiones fatales en animales de experimentación [12]. Se cree que la isoniacida induce convulsiones por su interferencia con la síntesis de GABA, a través de la inhibición de la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD, por sus siglas en inglés, glutamic acid descarboxylase), lo cual conlleva a un agotamiento de GABA [13, 14].

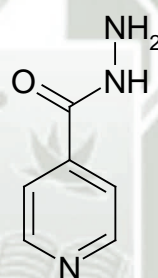


Figura I.9. Estructura química de Isoniacida.

La isoniacida puede provocar convulsiones en un paciente con desordenes convulsivos, más es raro en pacientes sin tener un historial de convulsiones previo. Sin embargo unos pocos pacientes han desarrollado convulsiones con una dosis convencional de isoniacida [51].

4.3.2. Datos químicos

Está dentro del grupo de las hidrazidas, siendo, por su estructura, un derivado del ácido nicotínico. Es soluble en solventes polares y ligeramente soluble en etil éter.

4.3.3. Mecanismo de acción en el tratamiento contra la tuberculosis

La isoniacida es un agente bactericida contra organismos del género *Mycobacterium*, específicamente de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*. La isoniacida es una pro-droga y debe ser activada por una enzima bacteriana catalasa-peroxidasa llamada KatG. La KatG une el acil isonicotínico con NADH para formar un complejo. Este complejo se une fuertemente a la cetoenilreductasa, conocida como InhA, provocando el bloqueo del sustrato natural de enoil-AMPc y la acción de la ácido graso sinteasa. Este proceso inhibe la síntesis de ácido micólico, requerido para la formación de la pared celular de las micobacterias [52].

La isoniacida es bactericida para micobacterias que se dividen rápidamente, pero es bacteriostática con micobacterias de crecimiento lento. La isoniazida inhibe el sistema P450.

4.3.4. Mecanismo de acción de la inducción de convulsiones

La posible etiología de las convulsiones inducidas por isoniazida, involucran la disminución de la disponibilidad de GABA. Los metabolitos de la isoniazida, como las hidrazonas de isoniazida, inhiben a la fosfoquinasa de la piridoxina. Esta enzima convierte la piridoxina (Vitamina B6) en su forma activa, piridoxal-5-fosfato. Este último, es cofactor de la GAD, la cual es requerida para la síntesis de GABA, que es el neurotransmisor más inhibitor del SNC. Y es debido a esta disminución de GABA, que aumenta la susceptibilidad a sufrir convulsiones [53].

5. *Lepidium meyenii* L.

5.1. Introducción.

El género *Lepidium* L. posee una amplia distribución, en todo el mundo aproximadamente se ha identificado 175 especies. *Lepidium meyenii* L. (Maca) (figura I.10) es una especie andina que posee una distribución limitada, restringida a altitudes desde 3500 m.s.n.m. que ocasionalmente alcanzan los 4500 m.s.n.m. El perfil taxonómico está basado en observaciones morfológicas, aunque de todos los ecotipos de maca, ninguno de ellos tiene semejanza alguna con otras especies del mismo género. Se ha propuesto el cambio de nombre de esta especie a *Lepidium peruvianum* Chacón; sin embargo, los dos nombres son usados como sinónimos. Las condiciones climáticas de desarrollo para la maca son importantes para la producción de su perfil tanto químico como farmacológico [16]. Esta especie es cultivada en Junín, departamento de Perú, localizado a 230 km de la ciudad de Lima y a una altitud de 4300 m.s.n.m. [16].



Figura I.10. Maca cosechada con la parte aérea y el hipocotilo fresco.

Fuente: www.lamolina.net.

El intervalo del cultivo hasta la cosecha es durante todo el año. En la cosecha los hipocotilos son separados de sus partes aéreas. Estos son limpiados y expuestos al sol para que puedan secarse. Este proceso demora

desde semanas a 3 meses. Los hipocotilos secos pueden ser almacenados por años antes de ser consumidos [16].

Los hipocotilos de *Lepidium meyenii* L. (figura I.11) han sido usados por siglos en los Andes por sus propiedades nutricionales y medicinales. Sobre todo por la mejora en la fertilidad en animales y humanos. La población peruana que habita los Andes centrales indican una cantidad de consumo de maca de >20 g/día [15].



Figura I.11. Hipocotilos de *Lepidium meyenii* L.

Fuente: *Ethnobiology and ethnopharmacology of Lepidium meyenii (Maca), a plant from the Peruvian highlands.*[15]

5.2. Clasificación taxonómica.

La siguiente tabla presenta la clasificación taxonómica de *Lepidium meyenii* L.

Tabla I.3. División taxonómica de *Lepidium meyenii* L.

REINO	Vegetal
DIVISION	Fanerógamas
SUB DIVISION	Angiospermas
CLASE	Dicotiledóneas
ORDEN	Archiclamideas

FAMILIA	Rhoedales
GENERO	Brassicaceae
ESPECIE	Lepidium
VARIEDAD	<i>Lepidium meyenii</i> L.;
NOMBRE COMÚN	<i>Lepidium peruvianum</i> Chacón sp. Maca, Maca maca, Ayak chichita, Maka, Maino, Huto-huto, Ginseng peruano, Viagra peruano, Ayak willku, pepper weed, power root and herbal viagra.

Fuente: *Estudio del efecto anticonvulsivante del extracto pentánico de Lepidium peruvianum Chacón sp. (Maca) en ratas con epilepsia inducida por pilocarpina.* [18]

5.3. Composición química.

Los hipocotilos secos de Maca poseen aproximadamente un rango de 13 a 16% de proteínas, conteniendo una importante concentración de aminoácidos esenciales [15]. Un estudio demostró la cantidad de metabolitos primarios presentes en los hipocotilos secos de *Lepidium meyenii* L. donde afirman el contenido de 10.2 % de proteínas, 59% de carbohidratos, 2.2% de lípidos y 8.5% de fibra. También una cantidad de ácidos grasos insaturados (57.7%) como el ácido linoléico, el cual es el más abundante, seguido por palmítico y oleico. Por otro lado, los ácidos grasos saturados representan un 40.1% [54]. La tabla 1.4 muestra la composición de aminoácidos presentes en el hipocotilo.

Tabla 1.4. Composición de aminoácidos en *Lepidium meyenii* L.

Aminoácidos	mg/g de proteína
Leucina	91.0
Arginina	99.4
Felinalanina	55.3

Lisina	54.3
Glicina	68.3
Alanina	63.1
Valina	79.3
Isoleucina	47.4
Acido glutámico	156.5
Serina	50.4
Acido aspártico	91.7
Histidina	21.9
Treonina	33.1
Tirosina	30.6
Metionina	28.0
Hidroxiprolina	26
Prolina	0.5
Sarcosina	0.70

Fuente: *Chemical composition of Lepidium meyenii L.* [54]

Además se ha reportado la presencia de minerales en los hipocotilos de Maca, conteniendo hierro (16.6 mg/100g de materia seca), calcio (150 mg/100g de materia seca), cobre (5.9 mg/100g de materia seca), zinc (3.8 mg/100g de materia seca), potasio (2050 mg/100g de materia seca), entre otros [15, 55].

Lepidium meyenii L. posee una diversidad de metabolitos secundarios como los macaenos que son ácidos grasos insaturados [56]. Poseen una fracción esteroidea compuesta por β -sitosterol, campesterol y estigmasterol [15]. Por otro lado, también se determinó la presencia de otras sustancias esteroideas como el brassicasterol (9.1%), ergosterol (13.6%), campesterol (27.3%), ergostadienol (4.15%), and sitosterol (45.5%) [16].

Además, se demostró la presencia de alcaloides en los hipocotilos de maca, algunos de ellos fueron designados como macainas y de estos se han

hallado 4 tipos. También el alcaloide benzilado macaridina (figura I.12.) [56]. Se encontró dos alcaloides imidazólicos denominados lepidilin A y lepidilin B [57] (figura I.13).

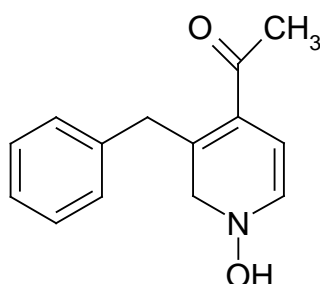


Figura I.12. Estructura química de macaridina.

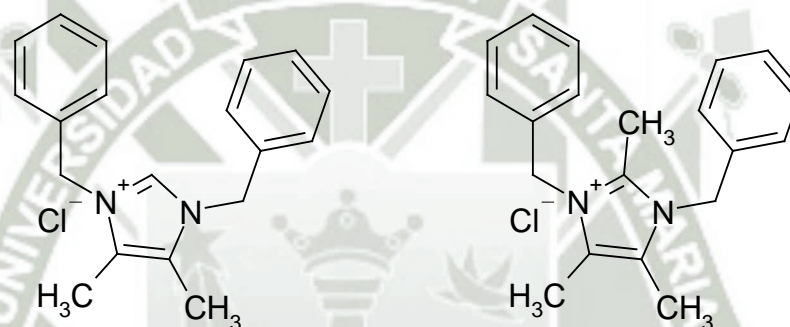


Figura I.13. Estructura química de lepidilin A (izquierda) y lepidilin B (derecha)

El alcaloide indólico ácido-(1R,3S)-1-metiltetrahydro- β -carbolina-3-carboxílico, conocido por sus siglas MTCA, es un derivado de triptófano o triptamina y pertenece al grupo de alcaloides tetrahydro- β -carbolinas (TH β Cs) [16].

TH β Cs es un grupo particular de alcaloides, algunos científicos han reportado que estos alcaloides son capaces de interactuar con el receptor de GABA_A, específicamente en el sitio de unión de las benzodiazepinas. La interacción manifiesta agonismo, antagonismo o agonismo inverso. Es decir, estos son capaces de lograr un efecto sedante, ansiolítico, ansiogénico, anticonvulsivante, proconvulsivante y convulsivante [58].

M TCA (figura I.14) ha sido identificado como una sustancia tóxica. Sin embargo, Gonzales y Gonzales-Castañeda afirma que M TCA no influye en la toxicidad sobre el consumo de maca, ya que este producto provee una diversidad de compuestos químicos con actividad biológica logrando que M TCA pierda el efecto tóxico sobre la salud [59].

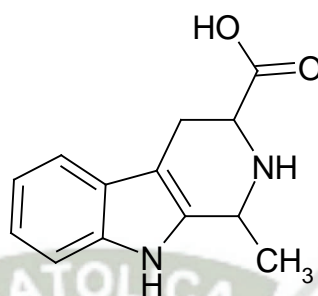


Figura I.14. Estructura química de M TCA.

Glucosinolatos son otro grupo importante de metabolitos secundarios presentes en los hipocótilos de *Lepidium meyenii* L. Estos contribuyen significativamente a sus propiedades farmacológicas y biológicas [16]. El principal glucosinolato es el compuesto benzilado (glucotropaeolin) y su derivado metoxi (metoxiglucotropaeolin) [60]. Altas concentraciones de glucosinolatos son encontrados en semillas, hipocotilos frescos y brotes frescos de Maca [16].

5.4. Macamidas.

Macamidas o alquilamidas son derivados lipídicos presentes en los hipocotilos de maca, también son interesante grupo de compuestos debido a la estructura similar a sustancias endógenas en vertebrados los cuales forman parte del sistema endocanabinoide [16]. Estas sustancias son extraídas por un proceso de extracción líquido-líquido con metanol y luego con n-pentano [31]. Se han reportado hasta ahora 19 macamidas, de los cuales 11 han sido sintetizados en el laboratorio de investigación de postgrado en *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University, Boston, USA* [61] (figura I.15).

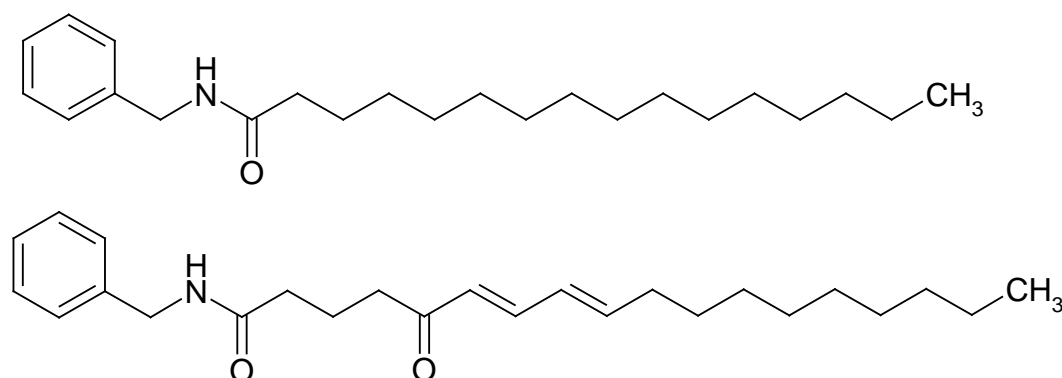


Figura I.15. Estructura química de macamida 1 (arriba) y macamida 2 (abajo)

El extracto pentánico demostró la capacidad de actuar como neuroprotector en ensayos *in vivo* e *in vitro*; es decir, pudo atenuar el daño producido por la inducción de un accidente cerebro vascular en ratas y evitó daño oxidativo en cultivos celulares [31]. Por otro lado, la semejanza estructural que poseen las macamidas con sustancias del sistema endocanabinoide, se comprobó el efecto y la relación con este sistema, demostrando que el extracto pentánico es capaz de inhibir la FAAH (*Fatty Acids Amide Hydrolase*, por sus siglas en inglés) enzima encargada de la degradación de anandamida (figura I.16) (endocanabinoide) hasta convertirlo en ácido araquidónico y etanolamina [17]. Es importante mencionar que los inhibidores de FAAH poseen efectos farmacológicos como analgesia, antiinflamatorio y neuroprotector [16].

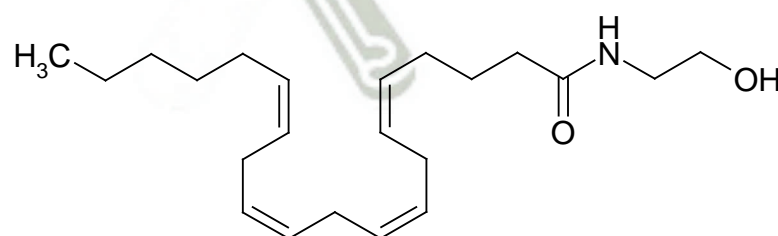


Figura I.16. Estructura química de anandamida (Endocanabinoide).

Se realizó el ensayo de inhibición de FAAH, evaluando las macamidas aisladas y demostrar cual tiene un efecto más potente. Cinco macamidas demostraron mayor inhibición de FAAH, estas fueron las correspondientes a los derivados de ácidos oléico, linoléico y linolénico, además de los derivados benzilamina o 3-metoxibenzilamina [61]. Por lo tanto, Pino-Figueroa sostiene que las macamidas podrían ser usados como indicadores de estandarización y también sus hallazgos farmacológicos podrían establecer la importancia de *Lepidium meyenii* L. [16].

5.5. Propiedades farmacológicas y medicinales de la Maca.

Gustavo F. Gonzales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia elaboró una revisión de la literatura científica de la actividad farmacológica de *Lepidium meyenii* L., la cual será expuesta en la Tabla I.5 [15].

Tabla I.5. Propiedades de la maca después de la administración *in vivo* en una serie de modelos farmacológicos.

Especie	Propiedades
Rata	Incremento de la cantidad y motilidad de esperm a.
	Incremento del comportamiento sexual masculino.
	Efecto Nutricional
	Efecto Antiestres
	Prevención de testosterona hiperplasia de próstata.
	Reversión de osteoporosis
	Efecto Neuroprotector
	Protección contra radiación UV, antioxidante, efectos sobre el metabolismo de glucosa y de lípidos.

Ratón	Incremento de comportamiento sexual masculino.
	Incremento de supervivencia de embiones.
	Prevención de testosterona hiperplasia de próstata.
	Incremento de número de crías.
	Mejoras en memoria y aprendizaje.
Cuy	Incremento de número de crías.
Peces	Nutricional
	Incremento de supervivencia de embiones.
Ganado Vacuno	Incremento en calidad y cantidad de espermatozoides.
	No se demostraron efectos sobre el apareamiento.

Fuente: *Ethnobiology and ethnopharmacology of Lepidium meyenii, a plant from the Peruvian highlands*. [15]

La actividad androgénica y estrogénica de la maca fueron determinadas utilizando cultivos celulares en ensayos *in vitro*, donde se evidenció la acción positiva de esta planta sobre estos modelos. De esta manera se comprobó la preferencia sobre este producto de los pobladores andinos que ellos refieren que es debido a sus efectos sobre la fertilidad y sobre el comportamiento sexual [16].

Por otro lado, el aceite esencial de la maca ha presentado una actividad antitermita. Este aceite presenta en su composición benziltiocianato, 3-metoxifenilacetnitrilo y β -ionona. Estos han demostrado una acción dosis dependiente en la actividad antitermita [16, 62].

Un estudio reportó el efecto del extracto etanólico de maca sobre osteoporosis en ratas ovariectomizadas. Al final del tratamiento muestras de orina y sangre fueron tomadas para análisis de calcio total, calcio inorgánico, osteocalcina sérica y fosfatasa alcalina. Aunque no se determinó diferencia significativa entre ratas ovariectomizadas y los controles, las ratas tratadas con maca mostraron mayores respuestas al tratamiento. Sin

embargo, este resultado sugiere que la maca podría ser utilizada en el tratamiento de osteoporosis postmenopausica [16, 63].

Glucosinolatos e isotiocianatos han recibido atención debido a su actividad biológica, particularmente en el rol protector contra el cáncer. Aunque no se ha determinado el mecanismo, se sugiere que glucosinolatos en el tracto gastro intestinal reaccionan con la enzima bacteriana mirosinasa esta produce isotiocianatos y otros productos que podrían neutralizar carcinógenos por un efecto antioxidante [16].

6. HPLC.

6.1. Introducción a la cromatografía

La cromatografía es un método físico de separación en el cual, los componentes a ser separados son distribuidos selectivamente entre dos fases inmiscibles, una fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés, *high performance liquid chromatography*) es un método que permite la separación de sustancias que tengan alguna de estas siguientes características: alta polaridad, alto peso molecular, inestabilidad térmica, tendencia a ionizarse en solución. [64]

Existen 5 componentes básicos en un equipo de HPLC, los cuales se muestran en la Figura I.17.. Estos son:

- a. Sistema de bombeo
- b. Sistema de inyección
- c. Columna (Sistema de separación)
- d. Sistema de detección
- e. Sistema de recolección de datos

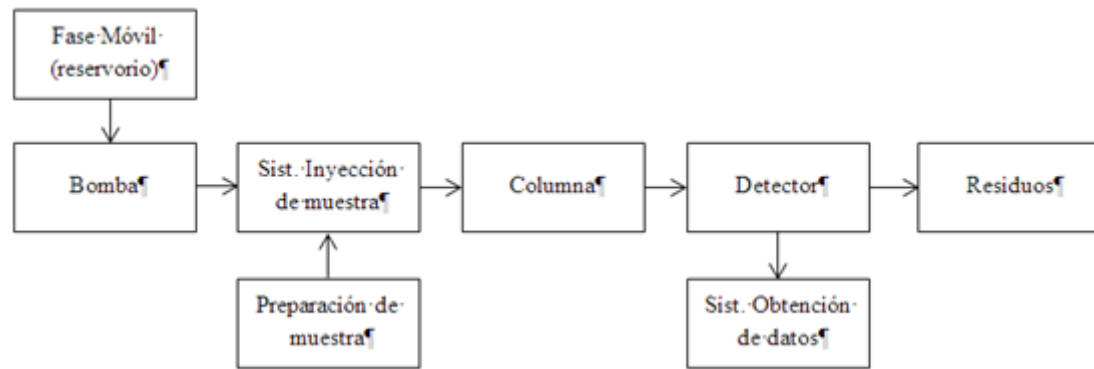


Figura I.17. Componentes básicos de un equipo HPLC.

En HPLC la columna se utiliza repetidas veces, la muestra se inyecta directamente con una jeringa o por una válvula en la columna, los solutos separados son detectados apenas emergen de la columna por un detector y la señal se guarda para tener un registro cuantificable de la separación cromatográfica [65-68].

6.2. Retención y difusión de los picos

El objetivo de la tecnología de columna en HPLC puede ser definido por la obtención de una combinación óptima de la resolución de los solutos, velocidad de elución, y uso económico de la presión [69]. La clave para obtener una buena resolución en cualquier forma de cromatografía es la combinación apropiada de la migración diferencial de los solutos y el control del esparcimiento de las bandas.

6.3. Cromatografía líquida de fase reversa

Esta referida a los sistemas en los cuales la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar. La fase estacionaria más comúnmente usada en este tipo de cromatografía consiste simplemente en cadenas alifáticas hidrocarbonadas unidas a la sílica [68, 70]. Y para el caso de los solventes polares se suele utilizar mezclas de metanol/agua o acetonitrilo/agua.

Las fases estacionarias conteniendo cadenas alifáticas de cuatro, ocho y dieciocho carbonos, llamadas fases C4, C8 y C18 respectivamente. Las C18 son principalmente utilizadas para separar solutos de relativo bajo peso molecular, mientras que las C4 son usadas para la separación de moléculas bastante más grandes [69].

6.4. Detectores

Existen varios tipos de detectores para la cromatografía líquida de alta resolución, siendo los más comunes los detectores UV (con longitudes de onda fija y variable), los electroquímicos, los de fluorescencia y de índice refractivo [70-73]. Existen ciertas especificaciones que deben considerarse con todo detector: linealidad, rango de dinámica lineal, sensibilidad, concentración mínima detectable y sensibilidad a la presión, flujo y temperatura.

6.5. Detección electroquímica

Es una técnica extremadamente selectiva y sensible de detección, que se aplica para muchos tipos de análisis como por ejemplo, el de los neurotransmisores dopamina, serotonina y noradrenalina. En combinación con los complementos adecuados, la detección electroquímica tiene un enorme rango dinámico lineal, significando que las concentraciones a ser medidas pueden ser tan bajas de hasta 50 pmol/L y tan altas como 100 μ mol/L o más. En la figura I.18. Se observa un diagrama de un sistema de HPLC con detección coulométrica electroquímica.

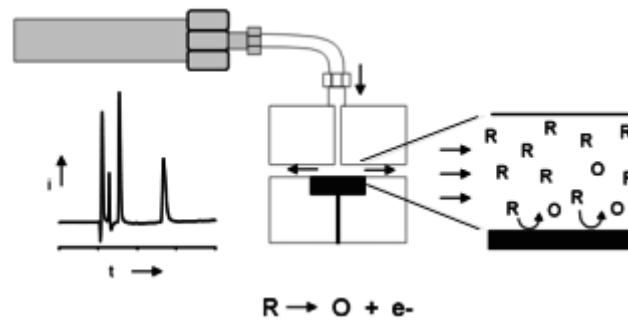


Figura I.18. HPLC con detección coulométrica electroquímica.

Fuente: "Antec, Electrochemical detection" [74]

6.6. Principio de detección

En la detección electroquímica la corriente eléctrica medida es la resultante de reacciones de oxidación o reducción. Una muestra es introducida al HPLC y separada en la columna cromatográfica, la columna está conectada a la celda del detector electroquímico, un sensor electroquímico donde tiene lugar una reacción en el electrodo. Las sustancias electroquímicamente activas que eluyen de la columna se someten a una reacción electroquímica, donde se transfieren electrones resultando en una corriente eléctrica. Los electrodos están conectados a un circuito electrónico con un potente amplificador, de bajo ruido, que convierte corrientes de pico o nanoamperios en una señal en el rango de ± 1 voltio, que es comúnmente usado en la adquisición de datos.

6.7. Cromatograma

El detector está conectado a una computadora donde los datos son recolectados y guardados en un software de adquisición de datos. El cromatograma resultante muestra la respuesta del detector y es usado para la identificación y cuantificación. Usando estándares de calibración, la altura de la señal (corriente, en nanoamperios) es directamente proporcional a la concentración del analito, y su tiempo de retención identifica a la sustancia.

6.8. Derivatización

El proceso de derivatización es utilizado para poder analizar sustancias electroquímicamente inertes. Esto se puede lograr de dos maneras: La modificación covalente de la sustancia inerte por una molécula que si es electroquímicamente activa, o la formación de un producto electroquímicamente activo a partir de la especie inerte. La derivatización puede ser también clasificada dentro de dos grupos, derivatización pre-columna, donde el producto se ha de formar antes de la separación cromatográfica de las especies derivatizadas; y derivatización post-columna, en la cual los analitos son derivatizados después de la separación cromatográfica y antes de la detección [75]

Se han utilizado una gran variedad de agentes derivatizantes en HPLC con detección electroquímica, reaccionando típicamente con residuos de aminas, ácidos carboxílicos o tioles; siendo todos estos evaluados exhaustivamente [76]. La derivatización de aminoácidos utilizando o-ftaldialdehído (OPA) y sulfito de sodio (Na_2SO_3) es un ejemplo clásico de la derivatización pre-columna (Figura I.19).

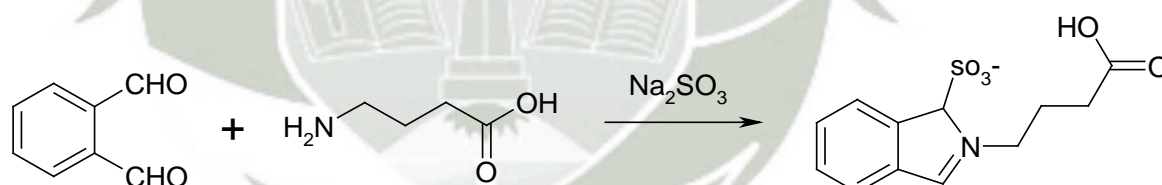


Figura I.19. Derivatización pre-columna del derivado electroactivo sulfonato, a partir de GABA, OPA y SO_3^{2-}

La cinética de reacción de la derivatización es bastante rápida, y el derivado sulfonato producto de esta reacción es bastante estable y el agente derivatizando OPA no es electroquímicamente activo de por sí, aun siendo utilizado en exceso, no interfiere en la separación y detección de los derivados de los aminoácidos.



II. MATERIALES Y METODOS.

1. MATERIALES.

1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1.1. Neuroblastoma B35.

Se utilizó la línea celular neuroblastoma B35 (ATCC®), esta se encontró almacenada a una temperatura de -200°C en una cámara de nitrógeno líquido en los laboratorios de investigación de *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University*, Boston, USA.

La muestra biológica se reconstituyó por incubación en medio de cultivo a condiciones adecuadas para su proliferación.

1.2. MATERIALES Y REACTIVOS.

1.2.1. Equipos utilizados.

Para la realización de este trabajo de investigación se utilizó una cámara de flujo laminar de presión positiva (Esco®, Class II Type A2), microscopio invertido (Olympus®, CKX31), celulómetro o contador de células (Nexcelum BioScience®, AutoT4), cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC, ESA®, Coulomchem II) con autosampler (ESA®, Model 542), sonicador (FisherScientific®, 40:0:15:4C), espectrofotómetro con lector de 96 celdas (Biotek Synergy HT), equipo de centrifugación (FisherScientific®, Marathon 16KM) y el medidor de pH (FisherScientific®, Accumet basic).



Figura II.1. Cámara de flujo laminar (Esco®, Class II Type A2)

1.2.2. Reactivos.

Los reactivos usados en la presente investigación fueron: solución de trypan blue, buffer fosfato salino, vigabatrina 99% , gabapentina 99% , isoniacida $\geq 99\%$, GABA $\geq 99.9\%$, fosfato diácido de sodio (NaH_2PO_4), dimetil sulfoxido (DMSO), o-phthaldialdehido (OPA), Na_2SO_3 , H_3PO_4 y etanol absoluto estos fueron obtenidos en Sigma Aldrich Co.®. Por otro lado, acetonitrilo y metanol de grado HPLC fueron obtenidos de Merck®.

Medio Dulbecco Modified Eagle (DMEM), Tripsina-EDTA, suero fetal de bovino (FBS), y MTS-assay fueron obtenidos de ATCC®.

Se utilizó el extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L. proporcionado por Alejandro Pino-Figueroa, PhD. Este extracto se encontraba almacenado a -80°C en los laboratorios de investigación de postgrado en *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University*, Boston, USA.

1.3. LUGAR DE INVESTIGACIÓN.

La investigación se realizó en los laboratorios de post-grado de School of Pharmaceutical Sciences de *Massachusetts College and Health Science University* (MCPHS University), Boston, USA.

2. METODOLOGÍA

2.1. EXTRACTO PENTANICO DE *Lepidium meyenii* L.

El extracto se obtuvo de la siguiente manera: Hipocotilos secos de *Lepidium meyenii* L. fueron obtenidos en Arequipa, Perú. Estos fueron identificados por la facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas de la Universidad Católica de Santa María.

Aproximadamente 750 g. de maca seca fueron pulverizados hasta la obtención de harina de maca. Esta harina fue macerada con 3 L de metanol (grado HPLC) por 48 horas obteniéndose un extracto que luego fue filtrado y concentrado hasta 1 L con un evaporador rotatorio. Luego este fue mezclado con una misma cantidad de agua destilada para continuar con una re-extracción continua líquido-líquido con 98% de *n*-pentano (Sigma Aldrich Co.®) por 24 horas. Después de este proceso el *n*-pentano fue evaporado en el evaporador rotatorio y el residuo sólido fue almacenado en refrigeración a -80°C.

El residuo sólido es reconstituido con una solución de 10% de DMSO disuelto en suero fisiológico.

2.2. PREPARACIÓN DE LAS DROGAS UTILIZADAS.

2.2.1. Preparación de las soluciones de vigabatrina (VGT, PM 126.16 g/mol).

Se disolvió 10 mg de vigabatrina en 10% de DMSO y suero fisiológico hasta obtener la disolución completa de la droga, luego se agregó volumen del diluyente hasta obtener 1 mL de solución. Se obtuvo la concentración de 77.4 mM. (mmol/L)

$$\frac{10 \text{ mg}}{1 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{129.16 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 77.4 \text{ mM}$$

A partir de esta solución stock (77.4 m M) se preparó soluciones para ensayos posteriores. Cuyas concentraciones fueron de 2, 10 y 20 m M . La siguiente ecuación esquematiza la dilución.

$$77.4 \text{ m M} \times X (\text{m L de sol.}) = \text{Conc deseada (m M)} \times 1 \text{ m L}$$

Se debe considerar la proporción de DMSO (10%), por lo tanto, se agrega cantidad suficiente de DMSO y suero fisiológico para que alcance este requisito.

Tabla II.1. Soluciones de vigabatrina.

Conc deseada (m M)	µL de Sol stock (77.4 m M)	µL de DMSO	µL de NaCl (0.9%)
20	260	74	667
10	130	87	783
2	26	97.4	876.6

Fuente: *Elaboración propia*

2.2.2. Preparación de las soluciones de gabapentina (GB, PM . 171.24 g/mol).

Se disolvió 10 mg de gabapentina con 10% de DMSO y suero fisiológico hasta obtener la disolución completa de la droga, luego se agregó volumen del diluyente hasta obtener 1 mL de solución. Se obtuvo una concentración de 58.39 m M . (m m ol/L)

$$\frac{10 \text{ m g}}{1 \text{ m L}} \times \frac{1 \text{ m m ol}}{171.24 \text{ m g}} \times \frac{1000 \text{ m L}}{1 \text{ L}} = 58.4 \text{ m M}$$

A partir de esta solución stock (58.4 m M) se preparó soluciones para ensayos posteriores, cuyas concentraciones fueron de 10 y 20 m M . La siguiente ecuación esquematiza la dilución.

$$58.4 \text{ m M } \times X (\text{m L de sol.}) = \text{Conc deseada (m M)} \times 1 \text{ m L}$$

Se debe considerar la proporción de DMSO (10%), por lo tanto, se agrega cantidad suficiente de DMSO y suero fisiológico para que alcance este requisito.

Tabla II.2. Soluciones de gabapentina.

Conc deseada (m M)	µL de Sol stock (58.4 m M)	µL de DMSO	µL de NaCl (0.9%)
20	342	66	592
10	171	83	746

Fuente: *Elaboración propia*

2.2.3. Preparación de las soluciones de isoniacida (INH, PM 137.14 mg/m mol).

Se pesó 27.5 mg de isoniacida, esta cantidad fue disuelta con 10% DMSO y suero fisiológico hasta obtener la dilución completa de la droga, luego se agregó volumen del diluyente hasta obtener 1 mL de solución. Se obtuvo una solución stock cuya concentración fue de 200 mM (mmol/L) de INH.

$$\frac{27.5 \text{ m g}}{1 \text{ m L}} \times \frac{1 \text{ m m o l}}{137.14 \text{ m g}} \times \frac{1000 \text{ m L}}{1 \text{ L}} = 200 \text{ m M}$$

A partir de esta solución stock (200 mM) se prepararon soluciones para realizar posteriores ensayos, cuyas concentraciones fueron de 20 mM y 10 mM. Para ello se elaboró la siguiente ecuación.

$$200 \text{ m M } \times X (\text{m L de sol.}) = \text{Conc deseada (m M)} \times 1 \text{ m L}$$

Se debe considerar la proporción de DMSO que es de 10%. Por lo tanto, se agrega cantidad suficiente de DMSO y suero fisiológico para que alcance este requisito.

Tabla II.3. Soluciones de isoniacida.

Conc deseada (m M)	µL de Sol stock (58.4 m M)	µL de DMSO	µL de NaCl (0.9%)
20	100	90	810
10	50	95	855

Fuente: *Elaboración propia*

2.2.4. Preparación de la solución stock del extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L. (EM)

El extracto pentánico de maca que se encuentra almacenado en los laboratorios de MCPHS University tiene una concentración de 5 mg/mL, donde 5 mg de extracto están disueltos en 1 mL de DMSO (98%). A partir de esta solución se prepararon las soluciones stock para trabajar en ensayos posteriores. El volumen final de cada solución fue de 2 mL, enrasando hasta el volumen final con 10% de DMSO disuelto en suero fisiológico. Las concentraciones deseadas fueron de 100, 200 y 400 µg/mL.

$$5000 \mu\text{g/mL} \times X (\text{mL de sol.}) = \text{Conc deseada} (\mu\text{g/mL}) \times 2 \text{ mL}$$

Se debe considerar la proporción de DMSO que es de 10%. Por lo tanto, se agrega cantidad suficiente de DMSO y suero fisiológico para que alcance esta proporción antes de agregar a los cultivos celulares.

Tabla II.4. Soluciones de extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L.

Conc deseada (µg/mL)	µL de Sol stock (5000 µg/mL)	µL de DMSO	µL de NaCl (0.9%)
400	160	184	1656
200	80	192	1728
100	40	196	1764

Fuente: *Elaboración propia*

2.3. CULTIVO CELULAR.

Se debe mencionar que el proceso de cultivo celular fue elaborado en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar de presión positiva y constantemente se inhibió la proliferación microbiana con etanol al 70%.

Se seleccionó la línea celular neuroblastoma B35, esta se encontraba almacenada en una cámara de nitrógeno líquido a -200°C . Para conseguir la temperatura ambiente las células fueron colocadas en baño maría a 37°C y cuando estas alcanzaron la esta temperatura se sembraron en un frasco de incubación con medio Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) con 10% de suero fetal de bovino (FBS) y estas células se incubaron a una temperatura de 37°C con una atmósfera de 5% de CO_2 . Después de dos o tres días, se evidenció las formas desarrolladas de las células que se evidencia con la formación de dendritas, llamándose a este el primer pasaje. A partir de este se formaron nuevos pasajes.

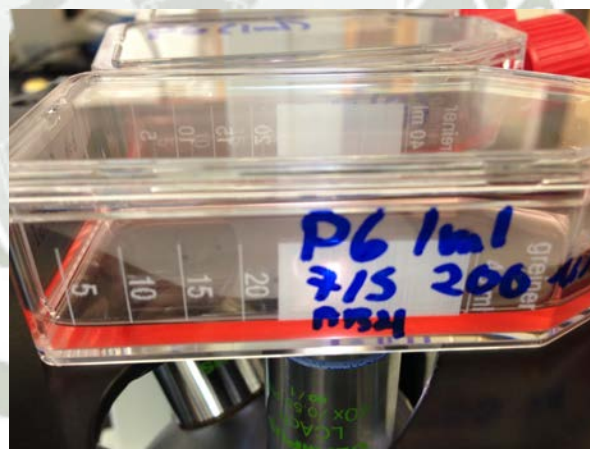


Figura II.2. Frasco de incubación

Para la generación de nuevos pasajes, se desechó el medio que contenía el frasco de incubación con el primer pasaje. Las células se encontraron adheridas a la base del frasco debido a la producción de colágeno, para desprender las células de la base se agregó 5 mL de Tripsina-EDTA con una agitación ligera que luego se desecha. Después, se agrega otros 5 mL de Tripsina-EDTA y este se incubaba a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 por

12 minutos, donde cada 3 minutos se debe hacer una agitación ligera. En este proceso vemos el desprendimiento de las células que se evidencia como una película grasa suspendida en el frasco.

Culminado este periodo se agregó 10 mL de medio DMEM sin FBS mezclando con el contenido del frasco de incubación para luego ser transferido a un tubo de 50 mL y se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos. Después se formó un pellet (precipitado de células) quitando el medio sobrenadante y se agregó 10 mL de medio DMEM con 10% FBS, el medio debe mezclarse con el pellet hasta que este pueda suspenderse dentro del medio, a esto se denomina suspensión de células.

2.3.1. CONTEO DE CÉLULAS VIABLES.

Se sacó 20 μ L de la suspensión de células y esta cantidad se colocó en un tubo eppendorf mezclando con 20 μ L de solución de tripan blue. De esta mezcla se colocó 20 μ L en una celda para conteo.

El contador de células (Celulómetro) fue configurado para el conteo de neuroblastoma B35, entonces se colocó la celda para conteo dentro del celulómetro. Finalmente, el equipo determinó el número de células por mL de medio y el porcentaje de viabilidad.

Una cantidad óptima de células para poder realizar ensayos es de 1×10^6 células/mL con una viabilidad mayor del 95% .

2.3.2. PRODUCCION DE GABA in vitro.

La suspensión de neuroblastoma B35 contenía 1.31×10^6 células/mL con una viabilidad de 97.1% y esta fue usada para los ensayos de producción de GABA .

Esta suspensión de células fue sembrada en *well plates* de 6 pozos en una cantidad de 5×10^5 células/pozo. El volumen fue completado con

medio DMEM con 10% FBS hasta 2 mL en cada pozo. Los cultivos fueron incubados por 2 días a 37°C y 5% de CO₂.



Figura II.3. Neuroblastoma B35 en *well plates* previo a administración de tratamientos.

Se debe mencionar que las soluciones con las drogas preparadas anteriormente (VGT, GB, INH y EM) fueron hechas a tal concentración para agregar 100 µL de drogas en cada pozo del *well plate*.

Se agregó a cada *well plate* 390 µL de la suspensión de células. Este hecho se describe en la siguiente ecuación:

$$\frac{5 \times 10^5 \left(\frac{\text{células}}{\text{pozo}} \right)}{1.31 \times 10^6 \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}} \right)} = 0.381 \frac{\text{mL}}{\text{pozo}} \rightarrow 390 \frac{\mu\text{L}}{\text{pozo}}$$

Tabla II.5. Composición de cada pozo de incubación.

Descripción	Cantidad en µL
Suspensión de células	390
Medio DMEM con FBS (10%)	1510
Droga o tratamiento	100
Volumen final	2000

Fuente: *Elaboración propia*

Una vez culminada la producción de GABA, se procedió con la obtención de muestra.

Se desechó cuidadosamente el medio de cada pozo, evitando dañar la película de células adheridas a la superficie de cada pozo. Luego se lavó con 0.5 mL de NaCl (0.9%) que fue desechado para volver a agregar 2 mL de NaCl (0.9%) mientras se produce el raspado de las células con la ayuda del *cell scraper*. Este proceso brindó la seguridad de que todas las células fueron extraídas y esto se evidenció con la ayuda del microscopio invertido.

Estas mezclas (células en NaCl 0.9%) fueron almacenadas a -80°C hasta el análisis posterior.

2.3.3. Producción de GABA por día.

Se sembró 5×10^5 células/pozo y fueron incubados a 37°C y 5% de CO_2 . Este proceso se dividió en 5 grupos con tres repeticiones cada uno. Cada grupo correspondió a la producción por GABA por día, correspondiendo el grupo 1 al primer día de incubación, grupo 2 al segundo día de incubación, grupo 3 al tercer día y así sucesivamente hasta el grupo 5 que fue el quinto día de incubación. Después del periodo de incubación, las muestras fueron extraídas de los *well plates* con el procedimiento descrito anteriormente.

2.3.4. Influencia de los tratamientos en la producción de GABA.

Se sembró 5×10^5 células/pozo y fueron incubados a 37°C y 5% de CO_2 . Estos cultivos fueron tratados con 100 μL de INH (0.5 y 1.0 mM), GB (0.5 y 1.0 mM), VGT (0.1, 0.5 y 1.0 mM) o EM (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). En los ensayos de INH, GB y VGT se realizó 3 repeticiones con su respectivo control que se sembró 100 μL de NaCl (0.9%) con DMSO (0.5%). Por otro lado, los ensayos con EM se hicieron 5 repeticiones con

su control. Después de 48 horas de incubación, las muestras fueron extraídas de los *well plates* con el procedimiento descrito anteriormente.

La cantidad de tratamientos usados en este ensayo determinó el número de grupos.

2.3.5. Efecto de tratamiento sobre la inhibición producida por INH (0.5 mM).

Se sembró 5×10^5 células/pozo e incubados a 37°C y 5% de CO_2 . Estos cultivos fueron tratados con 100 μL de INH (0.5 mM) y después de 1 hora de incubación se administró 100 μL de GB (1.0 mM), VGT (1.0 mM) o EM (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La incubación permaneció por 48 horas más hasta la extracción de muestras por el procedimiento descrito anteriormente. Cinco repeticiones fueron realizadas por cada grupo en este ensayo, también se utilizó un grupo control donde se administró 100 μL de NaCl (0.9%) con DMSO (0.5%).

2.3.6. Efecto en los niveles de GABA en células maduras.

Para determinar la presencia de la enzima GABA-T en la línea celular Neuroblastoma B35 las células fueron incubadas por 48 horas. Luego se administró los tratamientos GB (1.0 mM), VGT (1.0 mM) o EM (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se dejó incubando por otras 48 horas más a 37°C y 5% de CO_2 . La extracción de muestras se realizó por el procedimiento descrito anteriormente. Se realizaron 3 repeticiones por cada grupo, con su grupo control.

2.4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE LAS CÉLULAS FRENTE A LOS TRATAMIENTOS.

Se aplicó el ensayo de MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboxim etoxifenil)-

2-(4-sulfófenil)-2H-tetrazolium) para la viabilidad celular de neuroblastoma B35. Este ensayo contiene un reactivo derivado de tetrazolium, que reacciona con las enzimas mitocondriales formando un compuesto formazan, el cual es cromóforo, absorbiendo luz a una longitud de onda de 490 nm (azul). La viabilidad celular es directamente proporcional al color producido por el ensayo de MTS.



Figura II.4. Well plates con muestra, rotuladas para su cultivo.

Se incubó 2×10^4 células/pozo en well plates de 96 pozos, en medio de cultivo DMEM con FBS (10%) a 37°C y 5% de CO_2 , con las drogas usadas en esta investigación, INH (0.5 y 1.0 mM), GB (0.5 y 1.0 mM), VGT (0.1, 0.5 y 1.0 mM) o EM (5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), además de un control de DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%, con la finalidad de determinar si las concentraciones usadas afectan la viabilidad de esta línea celular. Después de 24 horas de incubación se agregó 10 μL de solución de MTS y se incubó por 3 horas más. Luego de este periodo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro de 96 pozos a 490 nm.

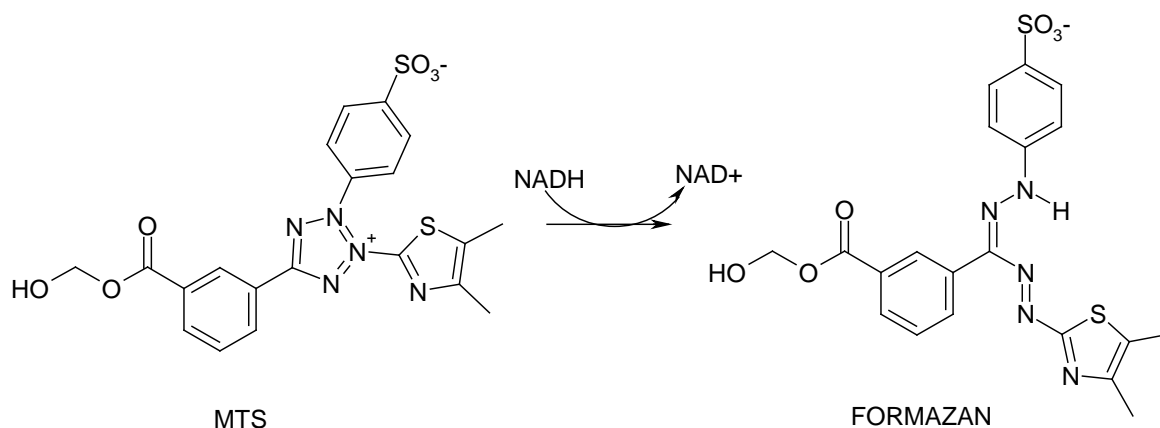


Figura II.5. Reacción del ensayo MTS.

2.5. ANALISIS CROMATOGRAFICO.

2.5.1. Preparación de la muestra.

Las muestras almacenadas a -80°C fueron descongeladas hasta alcanzar la temperatura ambiente. Luego éstas fueron sonicadas por 3 minutos con la finalidad de romper la membrana celular y provocar la liberación de GABA. Después de este proceso, se homogenizó y se tomó una alícuota de $250\ \mu\text{L}$, el resto de la muestra fue almacenado a -80°C . La alícuota fue centrifugada a $13000\ \text{rpm}$ por 5 minutos con la finalidad de precipitar sustancias de elevado peso molecular. El sobrenadante fue utilizado para el posterior análisis cromatográfico.



Figura II.6. Cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC, ESA®, Coulom chem II) con autosampler (ESA®, Model 542).

2.5.2. Preparación del gráfico de calibración.

Se pesó 1 mg de GABA, y se disolvió en 1 mL de agua de-ionizada. A partir de esta solución se hizo diluciones hasta obtener 1 $\mu\text{g/mL}$ de solución el cual será catalogado como nuestro stock.

A partir de este stock se tomó 20, 40, 60, 80 y 100 μL y se disolvió hasta 1 mL, estas nuevas soluciones fueron usadas en la preparación del gráfico de calibración. Donde las concentraciones fueron de 20, 40, 60, 80 y 100 ng/mL respectivamente.

2.5.3. Proceso de derivatización.

Se preparó una solución stock de OPA/ SO_3^{-2} disolviendo 22 mg de OPA en 0.5 mL de etanol absoluto mezclándose con 0.5 mL de una solución de Na_2SO_3 (1 M). Esta última mezcla se disolvió con 9 mL de solución de tetraborato de sodio (0.1 M). El pH de esta solución fue ajustado hasta 10.4 agregando gotas de NaOH (0.5 M).

Se tomó 50 μL de la solución stock de OPA/ SO_3^{-2} diluyendo esta cantidad con 5 mL de agua de-ionizada, esta última mezcla se denomina solución de trabajo.

El proceso de derivatización pre-columna se realizó mezclando 20 μL de la solución de trabajo con 10 μL de muestra o estándar de GABA en un vial para *autosampler* dejándose reaccionar por 10 minutos. Luego de este periodo se procede a la cuantificación del analito.

2.5.4. Condiciones cromatográficas.

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta performance con detector electroquímico (HPLC-ED) Coulomchem II (ESA[®]) con autosampler. También se utilizó una columna de fase reversa C-18 HR-80 (ESA[®]) de 4.6 x 80 mm, 3 μm de tamaño de partícula y 80 Å de tamaño de poro.

La fase móvil utilizada en este proceso fue isocrática y estuvo compuesta por 220 mL de metanol, 50 mL de acetonitrilo, 820 mL de 0.1 M NaH_2PO_4 , el pH fue ajustado a 4.6 con H_3PO_4 . El flujo usado fue de 1 mL/minuto.

Los potenciales de celda fueron ajustados de la siguiente manera: E_{GC} : 650 mV, E_1 : 150 mV y E_2 : 600 mV. La información fue adquirida de E_2 con el software P/C Chrom.

Los potenciales de celda fueron ajustados de la siguiente manera: E_{GC} : 650 mV, E_1 : 600 mV. La información fue adquirida con el software P/C Chrom.

2.6. ANALISIS ESTADÍSTICO DE DATOS.

2.6.1. Análisis de Varianza (ANOVA).

En el presente trabajo de investigación se determinó las diferencias significativas de los ensayos, se optó por el análisis de varianza (ANOVA). Esta es una técnica estadística que se utiliza para encontrar diferencia significativa en más de dos grupos de investigación.

Tabla II.6. Fórmulas para ANOVA.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico F
Entre de grupos	K - 1	SCE	$\frac{SCE}{K - 1} = CME$	$\frac{CME}{CMD} = F$
Dentro de grupos	N - K	SCD	$\frac{SCD}{N - K} = CMD$	
Total	N - 1	SCT		

Fuente: *Elaboración propia.*

Dónde:

N: Número de datos

K: Número de grupos experimentales

S.C.T.: Suma de cuadrados totales.

S.C.D.: Suma de cuadrados dentro de grupos.

S.C.E.: Suma de cuadrados entre los grupos.

Para probar la significación en la relación F se recurre a tablas. Se analiza si el valor calculado para F es menor o mayor que el que se indica en tablas de acuerdo a los grados de libertad. En el primer caso, se concluirá que todos los grupos son iguales, en caso contrario se concluirá que existe una diferencia estadística significativa entre al menos uno de los grupos.

2.6.2. Prueba *post-hoc* de Dunnet.

Si el resultado de ANOVA muestra la existencia de diferencia significativa entre los grupos, se procedió a encontrar la diferencia estadística significativa en comparación con un grupo, este fue el grupo “control” o vehículo (DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%). Para determinar esta información se elaboró la prueba *post-hoc* de Dunnet que se determina con la siguiente fórmula:

$$t_d = \frac{M_e - M_c}{\sqrt{2 \frac{MSE}{n}}}$$

Donde:

t_d : t experimental de test de Dunnet.

M_e : Media del grupo experimental.

M_c : Media del grupo control.

MSE: Varianza del error (*Mean Square error*)

n: Número total de sujetos en estudio.

El “ t_d ” se compara con el “ t teórico” que se observa en tabla de test de Dunnet (ANEXO IV).

Los grados de libertad (Gl) se obtienen con la siguiente fórmula:

$$Gl = N - a$$

Dónde:

N: Número total de sujetos.

a: Número total de grupos incluyendo el control.

Los datos presentados en esta investigación esta expresados con la media \pm E.S.M. (error estándar de la media), número de muestras ($n= 5$; $n=3$ pozos/grupo). Grupo control (DMSO 0.5 % disuelto en NaCl 0.9%). ANOVA $p<0.05$, seguido de una prueba de Dunnet para todos los grupos comparados con el grupo control.

El error estándar de la media se halla con la siguiente fórmula:

$$E.S.M. = \frac{DS}{\sqrt{n}}$$

Donde:

E.S.M.: Error estándar de la media.

DS: Desviación estándar poblacional.

n: Número de individuos por grupo.



III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. CULTIVO CELULAR.

La línea celular neuroblastoma B35 demostró un óptimo desarrollo en el procedimiento de cultivo celular utilizado en esta investigación.

El medio DMEM aportó los nutrientes necesarios y el FBS proporcionó los factores de crecimiento: estos son importantes para la diferenciación celular. Esto fue investigado por Schubert *et al.*, 1974, quien además de aislar e impulsar el uso de neuroblastoma de ratas, determinó características bioquímicas que fueron aprovechadas posteriormente [6]. Otros investigadores determinaron la importancia de la diferenciación celular en esta línea celular y los beneficios para la investigación en farmacología y toxicología [4]. En este trabajo se investigó la ruta metabólica de GABA en neuroblastoma B35.

En la Figura III.1. Se puede determinar el crecimiento y desarrollo de la línea celular, que se evidencia con la aparición de las formas dendríticas de las células y con el aumento de la densidad celular (cantidad de células) de acuerdo al tiempo de incubación.

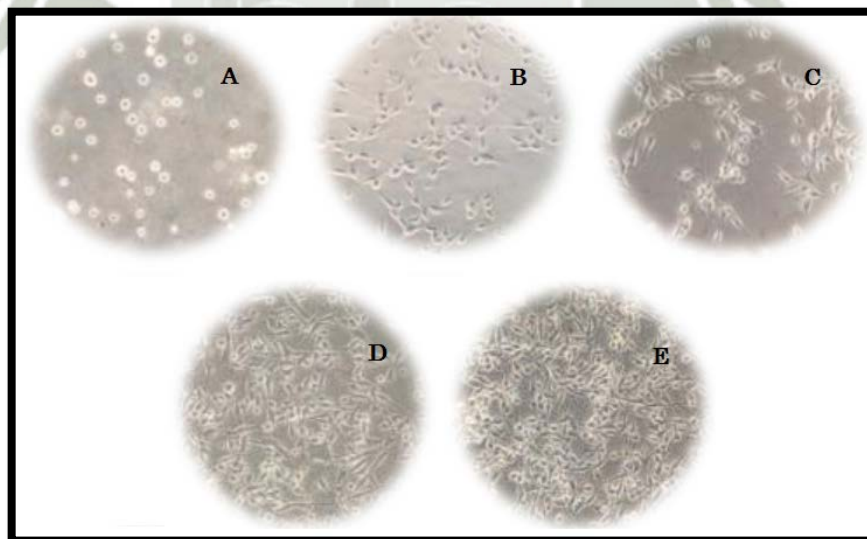


Figura III.1. Neuroblastoma B35 visto en microscopio invertido.

A, 0 horas de incubación a 100x. B, a 24 horas de incubación a 40x. C, después de 48 horas de incubación a 40x. D, después de tres días de incubación a 40x. E, después de cuatro días de incubación.

2. ANALISIS CROMATOGRÁFICO.

2.1. Resultados cromatográficos.

Las condiciones cromatográficas utilizadas en esta investigación demostraron ser las más adecuadas para aislar el pico del analito (GABA). Se analizaron 107 muestras que serán expuestas posteriormente.

La estructura química de GABA no es electroquímicamente detectable por HPLC-ED, por esta razón se realizó un proceso de derivatización pre-columna utilizando OPA/SO₃⁻², formando un derivado sulfonato con GABA (Figura I.19 y Figura III.2).

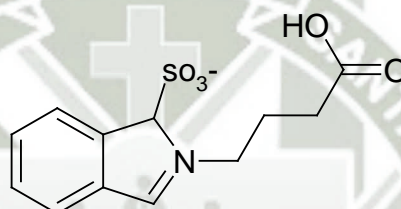


Figura III.2. Derivado sulfonato de GABA con OPA/SO₃⁻²

El derivado sulfonato de GABA y OPA/SO₃⁻² ha demostrado ser más electroactivo y estable que el derivado tiol formado con OPA/ β -mercaptoetanol [77]. Se puede evidenciar la estabilidad por la derivatización de GABA con OPA/SO₃⁻² en el reporte elaborado por ESA, inc. con información procedente de *Massachusetts College of Pharmacy and Health Science University*. (ANEXO II).

Sin embargo, la estabilidad del derivado OPA/SO₃⁻² ha sido cuestionada en muchas publicaciones, y consideran que este derivado solo es estable por 30 minutos a temperatura ambiente o 5 horas en hielo [78].

Con esta información es evidente la preferencia de usar derivados sulfonatos al momento de analizar neurotransmisores aminoacídicos debido a su cualidad de ser más electroactivos, fluorescentes y estables que su contraparte, los derivados tioles [77, 79]. Además, la derivatización de OPA/SO₃⁻² no produce el olor característico que genera la derivatización

con OPA/ β -mercaptoetanol que genera disconformidad al momento de realizar un análisis con estos reactivos [78].

La fase móvil (220 mL de metanol, 50 mL de acetonitrilo, 820 mL de 0.1 M NaH_2PO_4 , el pH fue ajustado a 4.6 con H_3PO_4) utilizada en esta investigación fue eficaz en la separación del pico de GABA y esto se evidencia en el cromatograma completo de la muestra (Figura III.3).

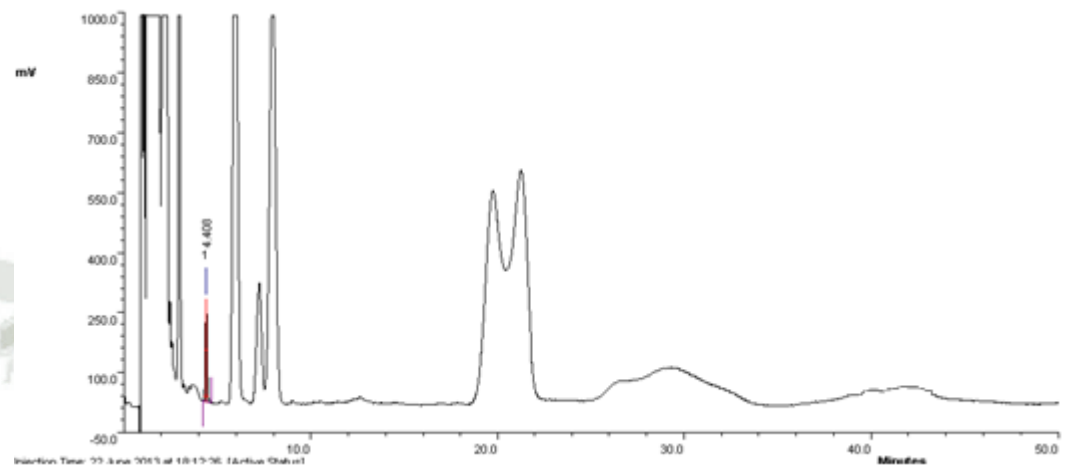
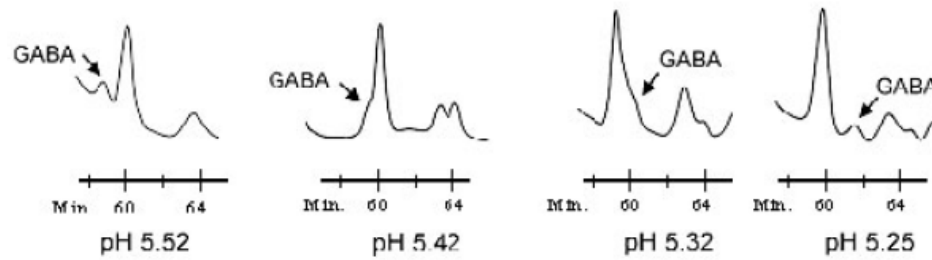


Figura III.3. Cromatograma del análisis completo de muestra, tiempo: 50 minutos

El tiempo de retención para GABA fue de 4.4 minutos, lo que se considera un pico rápido para este analito. Pero el tiempo de análisis fue de 50 minutos por muestra, para evitar la aparición de sustancias que pudiesen interferir en mediciones posteriores. Cabe tener en cuenta que muchos investigadores han demostrado que es usual que el pico de GABA tarde en eluir y prolongue la aparición de su señal a 25 minutos [78], 30 minutos [81] y 60 minutos [80].

El tiempo de retención obtenido para GABA a 4.4 minutos obtenido en la presente investigación es relevante, ya que publicaciones referentes a la separación del pico de GABA en análisis cromatográficos, tanto por detección electroquímica o fluorométrico, consideran vitales a los siguientes parámetros: a) pH, b) contenido y proporción de fase móvil, c) flujo de eluyentes, d) temperatura de análisis, entre otros.

En la Figura III.4 se puede observar que a ligeros cambios de pH marcan una alteración en la separación y forma del pico GABA en una muestra de microdialisis extraída del hipocampo en el cerebro [80].



III.4. Efecto de pH en la separación de GABA.

Tiempo de retención aproximadamente 60 min. Fase móvil metanol al 30% con buffer fosfato ajustado al pH deseado, flujo de análisis 0.95 mL/min.
Fuente: *HPLC conditions are critical for the detection of GABA by microdialysis.*

[80]

Con el fin de corroborar la identidad del GABA se superpuso la muestra con un estándar de GABA de 60 ng/mL confirmando que la sustancia analizada es GABA lo que se observa en la Figura III.5.

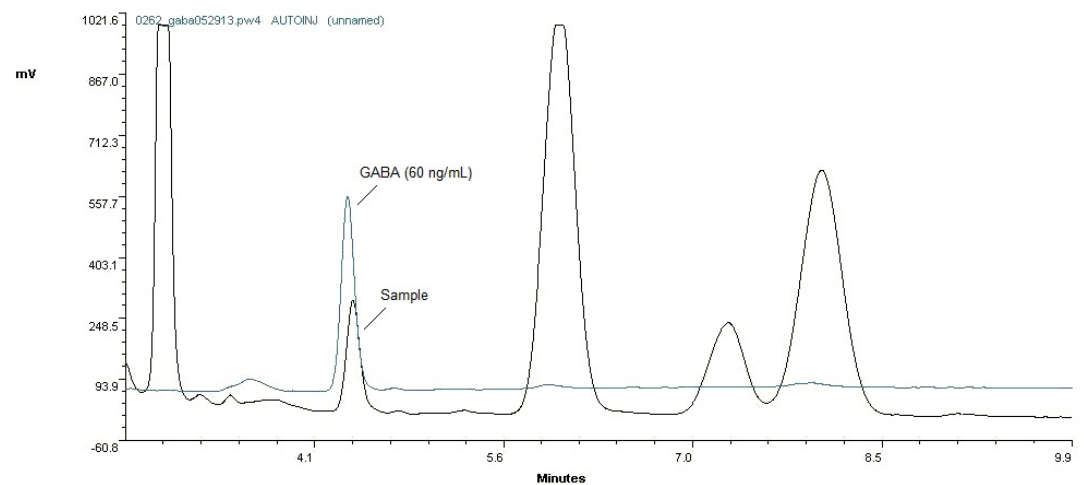


Figura III.5. Cromatograma de GABA con estándar (60 ng/mL).

2.2. Gráfico de Calibración.

Para elaborar un gráfico de calibración se prepararon 5 estándares de concentración conocida de GABA (20, 40, 60, 80 y 100 ng/ml) y se procedió al análisis por HPLC, obteniendo el cromatograma mostrado en la Figura III.6.

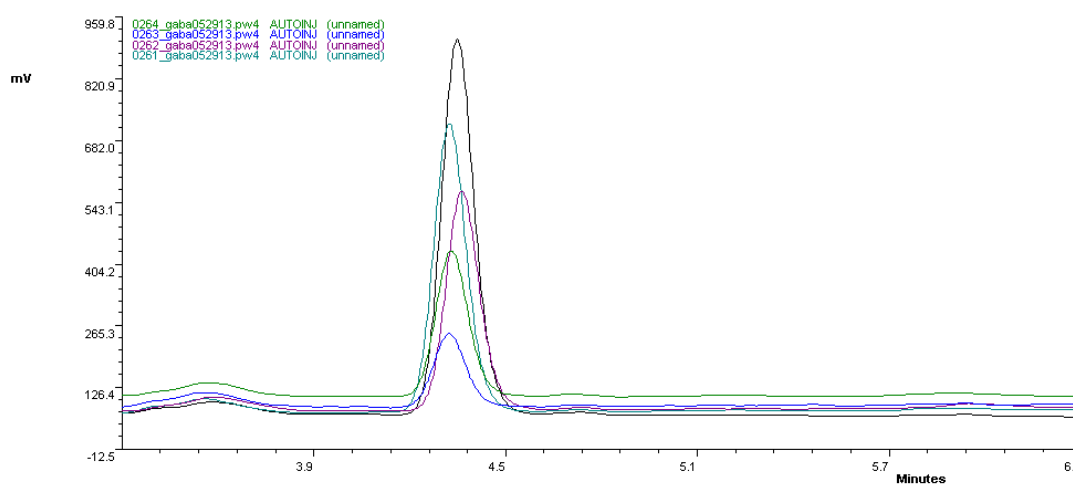


Figura III.6. Cromatogramas de los estándares de GABA usados en la curva de calibración.

El sistema PC/Chrom calculó el área bajo cada pico de las concentraciones conocidas de GABA y los resultados reportados por este software se muestran en la Tabla III.1.

Tabla III.1. Concentraciones de estándares de GABA

Concentración (ng/mL)	Área Bajo la Curva
20	1169.021
40	2330.068
60	3626.117
80	4641.97
100	6039.092

Fuente: *Elaboración propia.*

Con estos datos se elaboró un gráfico de calibración que está exhibido en la Figura III.7. Este gráfico demostró linealidad y esto se corroboró con el coeficiente de correlación (R^2) determinado que la ecuación obtenida de este gráfico de calibración nos proporciona la confiabilidad para utilizarla en la determinación de la concentración de GABA en los ensayos realizados en esta investigación.

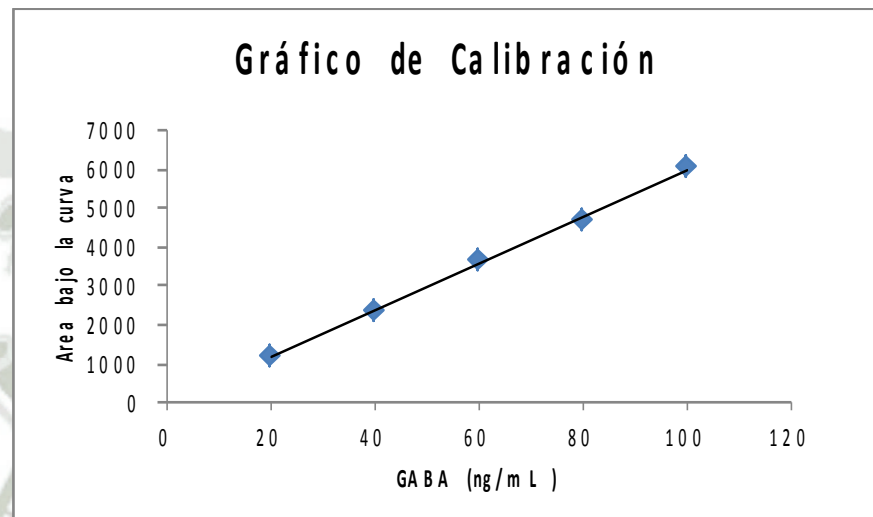


Figura III.7. Curva de calibración de GABA con derivatización OPA/SO_3^{-2} .

$$Y = 60.26X - 54.36$$

$$R^2 = 0.9983$$

3. PRODUCCIÓN DE GABA.

En la Figura III.8 se demuestra el aumento de los niveles de GABA producidos por la línea celular neuroblastoma B35 por día de incubación existiendo ciertos factores que favorecen la producción de GABA: uno de ellos es el medio de cultivo. Este aporta nutrientes necesarios para que puedan ser aprovechados por la célula. La composición del medio DMEM se encuentra en el ANEXO I.

Otro factor que aporta a la producción de GABA es el aumento de la densidad celular pues, hasta cierto punto, hay una relación directamente proporcional entre sí. Se puede observar que en el cuarto día, la producción de este neurotransmisor

alcanza el punto más alto con una concentración de 131.14 ± 1.00 ng/m L. Luego al quinto día la concentración permanece constante.

Las concentraciones obtenidas cada día durante 5 días consecutivos, son presentadas en la tabla III.2. El ensayo se realizó por triplicado.

Tabla III.2. Producción de GABA (ng/m L) por día.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
n 1	18.68	36.95	98.69	133.15	129.43
n 2	18.77	36.31	96.38	130.31	129.17
n 3	18.36	38.14	94.90	129.98	126.57
MEDIA	18.60	37.13	96.66	131.14	128.39
ESM	0.13	0.54	1.10	1.01	0.91

Fuente: *Elaboración propia.*

Estos datos se esquematizan en la Figura III.8.

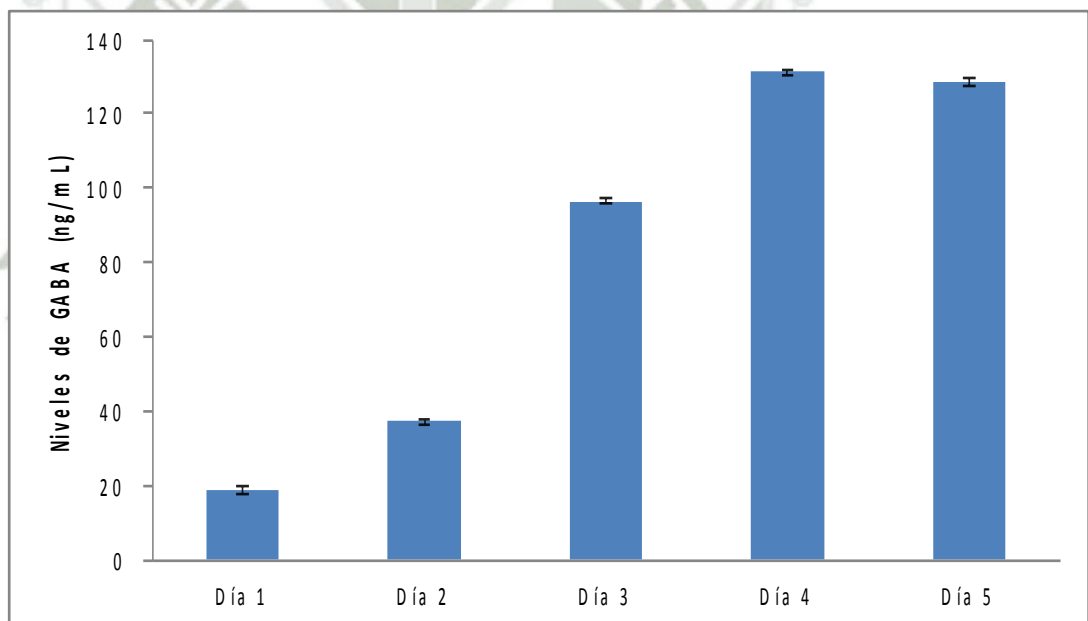


Figura III.8. Producción de GABA por día.

(n= 3 pozos/grupo).

Los niveles de GABA producidos por neuroblastoma B35 pueden ser interpretados como una fuente rápida de este neurotransmisor. Ya que con este hallazgo (Figura III.8) se puede afirmar que en comparación con otros ensayos *in vitro* de cultivos primarios (homogenizado de órganos, astrocitos, hipocampo,

etc.), los cultivos de neuroblastoma B35 producen GABA a las primeras 24 horas de incubación [28, 29].

Se debe recalcar que la investigación en la ruta metabólica de GABA es importante desde el punto de vista farmacológico. Ya que mejorar la inhibición producida por GABA es conveniente para tratar ciertas patologías como dolor crónico, desordenes de sueño, ansiedad y más importante epilepsia [21].

Algunas publicaciones reportan que se usa sustancias marcadas con isotopos radioactivos para cuantificar los niveles de GABA. En estos ensayos se altera el metabolismo y producción determinando cambios en la ruta metabólica de este neurotransmisor. Entre algunas sustancias usadas tenemos: ^{13}C glucosa y $[\text{U}^{13}\text{C}]$ glutamato, estos aumentan GABA en cultivos de neocortex neuronal [29].

3.1. INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS EN LOS NIVELES DE GABA.

Un volumen de 100 μL de las drogas: INH (0.5 y 1.0 mM), GB (0.5 y 1.0 mM) y VGT (0.1, 0.5 y 1.0 mM) fueron administradas y 100 μL del vehículo (DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%, considerado el grupo control) al momento de sembrar los cultivos de neuroblastoma B35. La administración de estas drogas influyó en los niveles de GABA comparados con el grupo control. Después de dos días de incubación las muestras fueron extraídas y los niveles de GABA cuantificados por HPLC-ED. Los resultados se presentan en la tabla III.3.

Tabla III.3. Influencia de los tratamientos en los niveles de GABA (ng/mL) a las 48 horas de incubación.

	DMSO 0.5 %	INH 0.5 mM	INH 1.0 mM	GB 0.5 mM	GB 1.0 mM	VG 0.1 mM	VG 0.5 mM	VG 1.0 mM
n 1	35.69	16.38	13.71	27.79	27.71	28.94	29.07	31.96
n 2	31.84	14.93	12.89	21.52	24.64	26.29	27.66	29.39
n 3	32.82	15.47	12.94	27.63	23.89	27.25	25.78	27.06
MEDIA	33.45	15.59	13.18	25.65	25.41	27.49	27.50	29.47
ESM	1.15	0.42	0.27	2.06	1.17	0.77	0.95	1.41

Fuente: *Elaboración propia.*

Con los datos obtenidos en la Tabla III.3 se procedió a hacer un ANOVA cuyos resultados se muestran en la Tabla III.

Tabla III.4. ANOVA de la influencia de los tratamientos en los niveles de GABA

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	7	996.35	142.34	35.48	0.000
Error	16	64.18	4.01		
Total	23	1060.53			

Fuente: *Minitab 16.*

Los resultados de los análisis de GABA producidos por neuroblastoma B35 mostraron diferencia significativa realizando un análisis de varianza (ANOVA) seguido del test *post hoc* "Dunnet". Esta prueba realiza una comparación con el grupo control (DM SO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%) (Ver Tabla III.5).

Tabla III.5. Test *post hoc* de Dunnet de la influencia de los tratamientos sobre los niveles de GABA

Nivel	N	Media	Agrupación
DM SO 0.5 % (control)	3	33.449	A
VGT 1.0 m M	3	29.471	A
VGT 0.5 m M	3	27.504	
VGT 0.1 m M	3	27.495	
GB 0.5 m M	3	25.649	
GB 1.0 m M	3	25.410	
INH 0.5 m M	3	15.593	
INH 1.0 m M	3	13.177	

Fuente: *Minitab 16.*

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

La concentración de 1.0 m M de VGT no mostró diferencia significativa comparada con el grupo control, pero los demás tratamientos si mostraron diferencia significativa, esta información está representada en la Figura III.9.

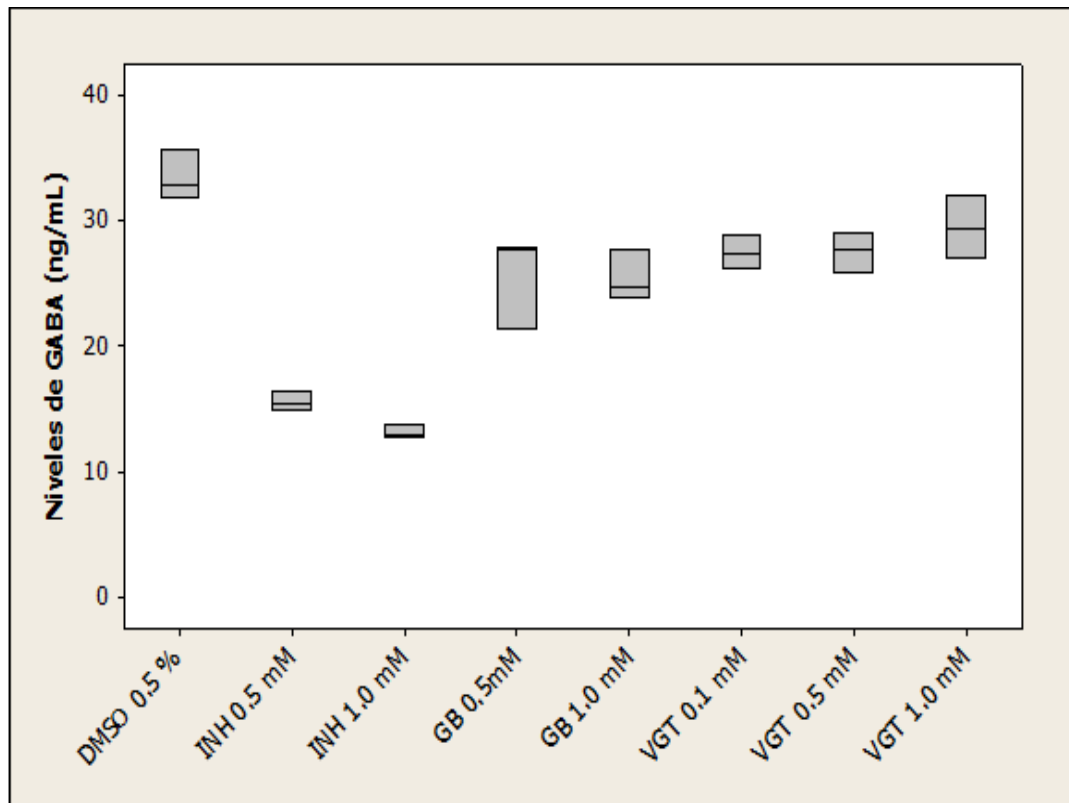


Figura III.9. Influencia de los tratamientos sobre los niveles de GABA producidos por Neuroblastoma B35.

La isoniacida, una droga usada para el tratamiento de la tuberculosis, que provoca una disminución en los niveles de GABA [12]. En este ensayo esta droga produjo un porcentaje de disminución de 53% para la concentración de 0.5 mM y de 60% para la de 1.0 mM (comparados con el grupo control). La disminución en los niveles de GABA por INH es producida por la inhibición de GAD, corroborando los resultados de Vergnes y colaboradores [13].

Además, la administración de gabapentina (0.5 y 1.0 mM) y vigabatrina (0.1; 0.5 y 1.0 mM) disminuyeron los niveles de GABA. Se sabe que estos dos fármacos aumentan los niveles de GABA por diversos mecanismos. Por un lado vigabatrina aumenta los niveles de GABA por inhibición de la enzima GABA-T, enzima encargada de la degradación de GABA [24]. Y por otro lado, gabapentina aumenta niveles de GABA por mecanismos que aun no están claros. Se ha demostrado que gabapentina no ejerce una acción

sobre GAD, pero aumenta niveles de glutamina [82]. También la gabapentina ha demostrado actuar en enzimas como: GABA-T (inhibición de un 33%) y glutamato deshidrogenasa (GDH) incrementando la actividad enzimática de esta última enzima [48].

Algunos investigadores sostienen que el aumento de GABA por gabapentina puede ser debido al incremento de glutamina. Ya que glutamina es degradada a glutamato por la enzima PAG y glutamato a GABA por GAD [83]. Se debe recalcar que glutamina juega un rol importante en el ciclo Glutamato/GABA-glutamina el cual sirve para reutilizar el NH_4^+ libre en el cerebro ya que carece del ciclo de la urea [84].

La administración oral de glutamina ha demostrado que a una dosis de 2.0 g/kg de peso en ratas aumentó significativamente los niveles de GABA en ciertas zonas del cerebro obtenidas en dializados. Cabe recalcar que glutamina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica con mucha facilidad, ya que esta sustancia es requerida para funciones energéticas-metabólicas en neuronas y glías [19].

Con la finalidad de observar la influencia del extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L sobre los niveles de GABA se administró 100 μL de EM y 100 μL del vehículo Después de dos días de incubación las muestras fueron extraídas y luego cuantificadas por HPLC-ED. Los datos se encuentran en la Tabla III.6.

Tabla III.6. Influencia del extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L. Sobre los niveles de GABA (ng/mL) a las 48 horas de incubación.

	DMSO 0.5 %	EM 5 $\mu\text{g/mL}$	EM 10 $\mu\text{g/mL}$	EM 20 $\mu\text{g/mL}$
n 1	44.69	42.50	41.42	43.78
n 2	41.90	42.47	39.72	46.26
n 3	41.61	44.03	44.29	48.21
n 4	42.27	45.09	39.25	44.26
n 5	41.14	43.51	42.22	44.53
MEDIA	42.32	43.52	41.38	45.41
ESM	0.62	0.49	0.91	0.82

Fuente: *Elaboración propia.*

Los niveles de GABA fueron comparados estadísticamente realizando un análisis de varianza (ANOVA), esto se observa en la Tabla III.7

Tabla III.7. ANOVA de Influencia de EM sobre los niveles de GABA.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	3	45.34	15.11	5.71	0.007
Error	16	42.38	2.65		
Total	19	87.72			

Fuente: *Minitab 16.*

Luego se realizó el test *post hoc* de Dunnet el cual determinó diferencia significativa comparados con el grupo control (DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%). (Ver Tabla III.8).

Tabla III.8. Test *post hoc* de Dunnet de la influencia de EM sobre los niveles de GABA

Nivel	N	Media	Agrupación
DMSO 0.5 % (control)	5	42.320	A
EM 20 μ g/mL	5	45.410	
EM 5 μ g/mL	5	43.521	A
EM 10 μ g/mL	5	41.380	A

Fuente: *Minitab 16.*

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

La concentración de 20 μ g/mL del extracto pentánico de *Lepidium meyenii L.* demostró un aumento significativo en los niveles de GABA a 45.41 ± 0.82 ng/mL, comparados con el control, el cual produjo 42.31 ± 0.62 ng/mL. Estos resultados están esquematizados en la Figura III.10.

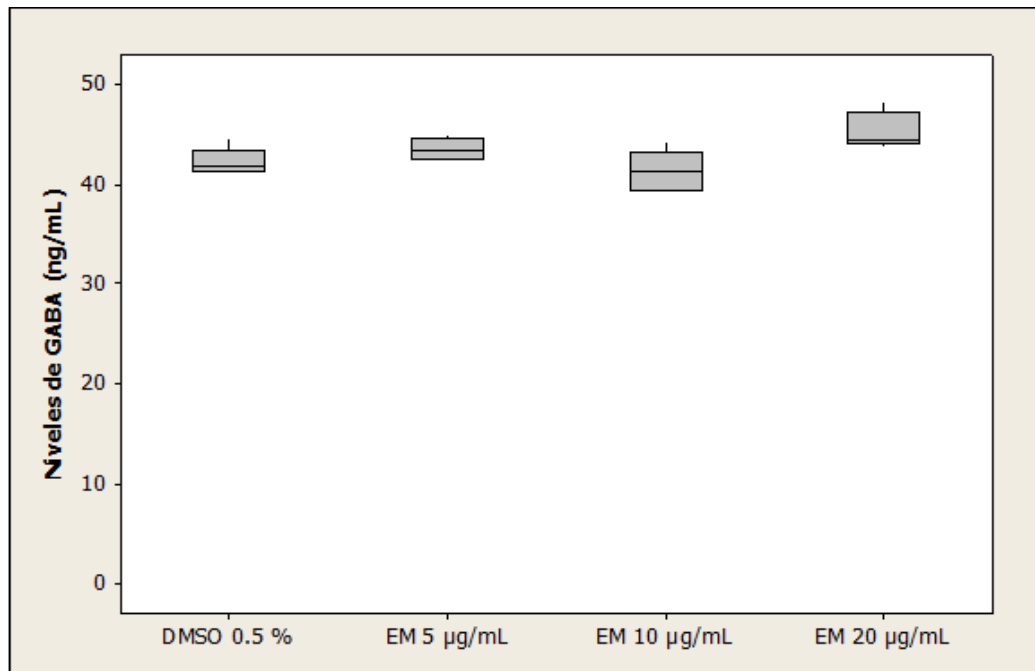


Figura III.10. Influencia de EM sobre los niveles de GABA producidos por Neuroblastoma B35.

En lo que a nosotros concierne, a la fecha no hay reportes sobre el efecto de *Lepidium meyenii L.* sobre la producción de GABA, de la alteración de la concentración de este neurotransmisor en el sistema nervioso central, y mucho menos que la maca haya producido letargo y sedación [15, 16] lo que sugiere que EM podría comportarse como un análogo de los Estás son características de anticonvulsivantes usuales [3]

Sin embargo, en un modelo experimental de epilepsia de lóbulo temporal se ha demostrado que el extracto pentánico de maca a dosis de 1 mg/kg en ratas wistar atenúan la frecuencia de *estatus epilepticus* inducido por pilocarpina [18]. Pero esto debe ser corroborado realizando un *screening* anticonvulsivante completo a este extracto.

El extracto pentánico de *Lepidium meyenii L.* posee sustancias denominadas macamidas. Estas sustancias han demostrado inhibir la enzima FAAH, que es importante en el sistema canabinoide, y se ha aceptado este como su mecanismo de acción. Con este hallazgo las macamidas han sido denominadas como posibles endocannabinoides [17]. No se ha encontrado publicaciones que sostienen la relación entre la inhibición de FAAH,

actividad anticonvulsivante, o efecto alguno sobre GABA y su sistema. En contraste, el sistema canabinoide es importante en la liberación de ciertos neurotransmisores como GABA, Glutamato, dopamina, etc. [31]

Por otro lado, algunas sustancias presentes en *Cannabis sativa* (Marihuana), planta conocida por sus efectos psicotrópicos y por poseer sustancias que actúan en el sistema canabinoide, han demostrado actuar sobre el sistema GABAérgico [85]. El $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol (THC), sustancia que produce el efecto alucinógeno en esta planta, demostró que a dosis bajas (0.002 mg/kg, en ratones) es capaz de atenuar las deficiencias cognitivas ocasionadas por pentilentetrazol, la que posee la función de antagonizar GABA en sus receptores ionotrópicos produciendo convulsiones y deficiencias cognitivas [86].

Otra sustancia presente en la marihuana es el canabidiol, a diferencia de THC, este no produce efectos alucinógenos; sin embargo, el canabidiol ha demostrado atenuar en modelos experimentales *in vivo* de convulsiones inducidas por electrochoque máximo, convulsiones audiogénicas y mercaptopropanol. También se ha reportado que el canabidiol es un candidato terapéutico para un diverso rango de epilepsias humanas. El canabidiol ejerce su efecto anticonvulsivante por una acción no dependiente de la vía de receptores cannabinoide; aunque el mecanismo anticonvulsivante de esta sustancia no es claro, aún continúan los estudios con esta sustancia [87].

3.2. EFECTO DE TRATAMIENTOS SOBRE LA INHIBICIÓN PRODUCIDA POR INH

Con la finalidad de demostrar algún efecto sobre la inhibición producida por isoniácida en la producción de GABA. La línea celular neuroblastoma B35 fue incubada con 100 μ L de isoniácida (0.5 mM) al momento de sembrar en los *well plates* y luego se le administró 100 μ L de los tratamientos: EM (5, 10 y 20 μ g/mL), GB (1.0 mM) y VGT (1.0 mM); además de 100 μ L del vehículo (DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%).

Después de dos días de incubación las muestras fueron extraídas para cuantificar los niveles de GABA por HPLC-ED. Los resultados de este ensayo se encuentran en la Tabla III.9.

Tabla III.9. Influencia de los tratamientos en la inhibición de Isoniacida (0.5 m M) sobre los niveles de GABA (ng/m L) a las 48 horas.

	DMSO 0.5 %	EM 5 µg/mL	EM 10 µg/mL	EM 20 µg/mL	GB 1.0 mM	VG 1.0 mM
n 1	19.22	19.15	16.35	18.09	26.18	21.46
n 2	21.16	20.86	16.46	17.38	27.23	16.92
n 3	23.90	18.24	17.97	15.77	23.58	19.57
n 4	19.93	18.53	17.82	18.69	20.63	18.08
n 5	20.24	20.96	17.83	18.78	22.75	18.83
MEDIA	20.89	19.55	17.29	17.74	24.07	18.97
ESM	0.81	0.58	0.36	0.55	1.19	0.76

Fuente: *Elaboración propia.*

Con los datos obtenidos en la Tabla III.9 se realizó un análisis de varianza (ANOVA) el cual está representado en la Tabla III.10.

Tabla III.10. ANOVA del efecto de los tratamientos sobre la inhibición producida por INH (0.5 m M)

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	5	153.68	30.74	10.79	0.000
Error	24	68.36	2.85		
Total	29	222.03			

Fuente: *Minitab 16.*

Una vez que estos niveles fueron determinados se realizó el test estadístico de Dunnet comparando con el grupo control (vehículo).

Tabla III.11. Test *post hoc* de Dunnet del efecto de los tratamientos sobre la inhibición producida por INH (0.5 m M)

Nivel	N	Media	Agrupación
DMSO 0.5 % (control)	5	20.890	A
GB 1.0 m M	5	24.075	
EM 5 μ g/m L	5	19.549	A
VGT 1.0m M	5	18.972	A
EM 20 μ g/m L	5	17.743	
EM 10 μ g/m L	5	17.288	

Fuente: *Minitab 16*.

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

En la Figura III.11 se puede observar cambios significativos en los niveles de GABA producidos por neuroblastoma B35. Como es el caso de la administración de extracto pentánico de *Lepidium meyenii L.* a las concentraciones de 10 y 20 μ g/m L; y la gabapentina a la concentración de 1.0 m M.

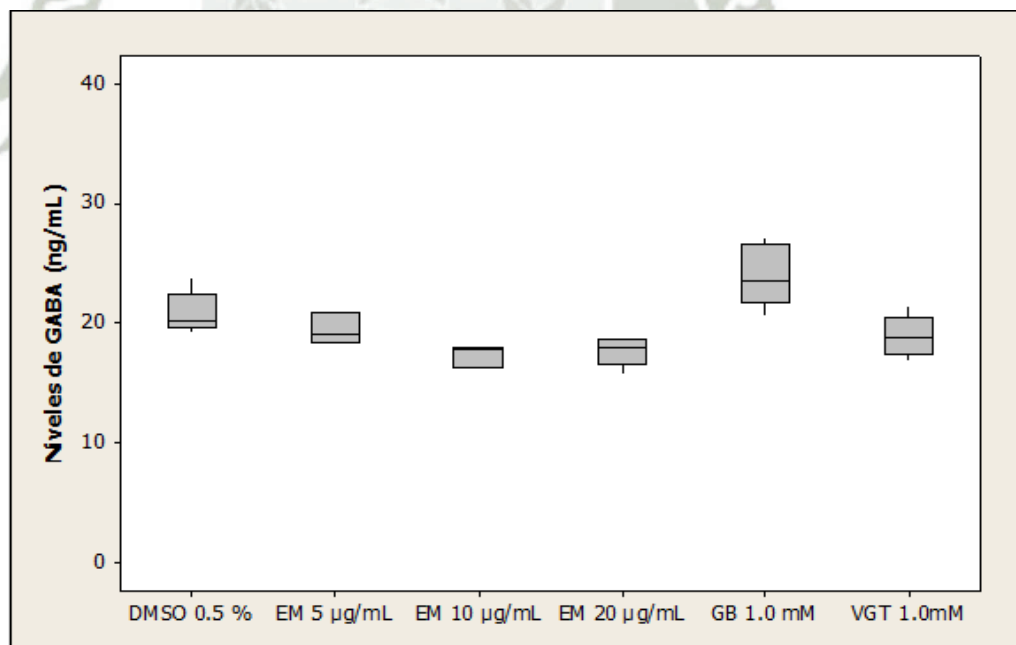


Figura III.11. Efecto de los tratamientos sobre la inhibición de GAD producido por INH (0.5 m M)

El modelo farmacológico de isoniacida para inducir condiciones patológicas se ha sido usado en ensayos *in vivo* e *in vitro*; además, esta droga es usada como parte de ensayos *screening* de nuevas drogas anticonvulsivantes [88]. Por ejemplo, se administró isoniacida (10 mM) a cultivos de células de Purkinge demostrando la reducción de los niveles de GABA. Estos niveles de GABA fueron cuantificados por ensayos electrofisiológicos [89].

También isoniacida ha sido usada para determinar el efecto anticonvulsivante de extractos vegetales, con la finalidad de obtener referencia de drogas de origen natural, para establecer el consumo de plantas con actividad terapéutica [90].

Los resultados obtenidos han mostrado que el extracto de *Lepidium meyenii* L. (10 y 20 µg/mL) disminuye significativamente los niveles de GABA. Con esta información se recomienda evaluar la competencia que puede existir entre isoniacida y macamidas para GAD. Se sugiere seguir investigando.

Por otro lado, gabapentina a la concentración de 1.0 mM demostró atenuar el efecto producido por isoniacida y aumentó significativamente los niveles de GABA a 24.07 ± 1.19 ng/mL comparado con el grupo control que recibió DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9% que produjo 20.89 ± 0.81 ng/mL de GABA. Este es un detalle muy particular de esta droga ya que según la bibliografía se ha demostrado que gabapentina aumenta significativamente niveles de GABA en cerebros de pacientes con epilepsia en comparación con sujetos sanos. Esto podría sugerir la cualidad de la gabapentina en aumentar su efecto cuando el sujeto posee una condición epiléptica [91].

Además, gabapentina ha sido capaz de atenuar convulsiones inducidas por fuentes físicas (electrochoques y audiogénicas) como químicas (pentilentetrazol, tiosemicarbámid, isoniacida, bicuculina, picrotoxina y 3-mercaptopropionato) en ensayos *in vivo*. Otra ventaja de la gabapentina es la carencia de interacciones con otras drogas, y este es un problema muy frecuente en otros anticonvulsivantes [91].

3.3. EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS SOBRE CÉLULAS MADURAS

Se incubaron cultivos celulares de la línea celular neuroblastoma B35 por dos días, después de ese periodo se administró 100 μ L de GB (1.0 mM), VGT (1.0 mM), EM (5, 10 y 20 μ g/mL) y 100 μ L del vehículo (DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%). Las células fueron incubadas por 2 días más con la finalidad de evaluar el efecto de estas drogas sobre células maduras. Después de este periodo de incubación de esta línea celular se extrajeron las muestras y se cuantificó los niveles de GABA por HPLC-ED. Los datos de concentración obtenidos se muestran en la Tabla III.12.

Tabla III.12. Influencia de los tratamientos en la células maduras sobre los niveles de GABA (ng/mL)

	Control	EM 5 μ g/mL	EM 10 μ g/mL	EM 20 μ g/mL	GB 1.0 mM	VGT 1.0 mM
n 1	119.34	141.86	134.22	113.70	97.74	131.68
n 2	111.89	149.16	154.54	120.41	101.63	122.89
n 3	122.31	120.72	145.21	122.83	97.56	146.28
MEDIA	117.85	137.25	144.66	118.98	98.98	133.62
ESM	3.10	8.53	5.87	2.73	1.33	6.82

Fuente: *Elaboración propia.*

Se determinó los niveles de GABA y con estos se realizó el ensayo estadístico ANOVA seguido por el test *post hoc* de Dunnet, comparando los 5 grupos con el grupo control (DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%). Ver Tabla III.13 y Tabla III.14.

Tabla III.13. ANOVA de los efectos de los tratamientos sobre células maduras.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	5	4124.8	825.0	9.56	0.001
Error	12	1035.4	86.3		
Total	17	5160.2			

Fuente: *Minitab 16.*

Tabla III.14. Test *post hoc* de Dunnet de los efectos de los tratamientos sobre células maduras.

Nivel	N	Media	Agrupación
DMSO 0.5 % (control)	3	117.848	A
EM 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3	144.657	
EM 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3	137.248	A
VGT 1.0m M	3	133.617	A
EM 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3	118.982	A
GB 1.0 m M	3	98.977	A

Fuente: *Minitab 16*.

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

La Figura III.12 esquematiza los resultados hallados en este ensayo. Estos demuestran que existe diferencia significativa en el grupo de células tratadas con $10\mu\text{g}/\text{mL}$ de EM, más no en el tratado con la concentración de $20\mu\text{g}/\text{mL}$ en comparación con el grupo control (DMSO 0.5% disuelto en 0.9% de NaCl)

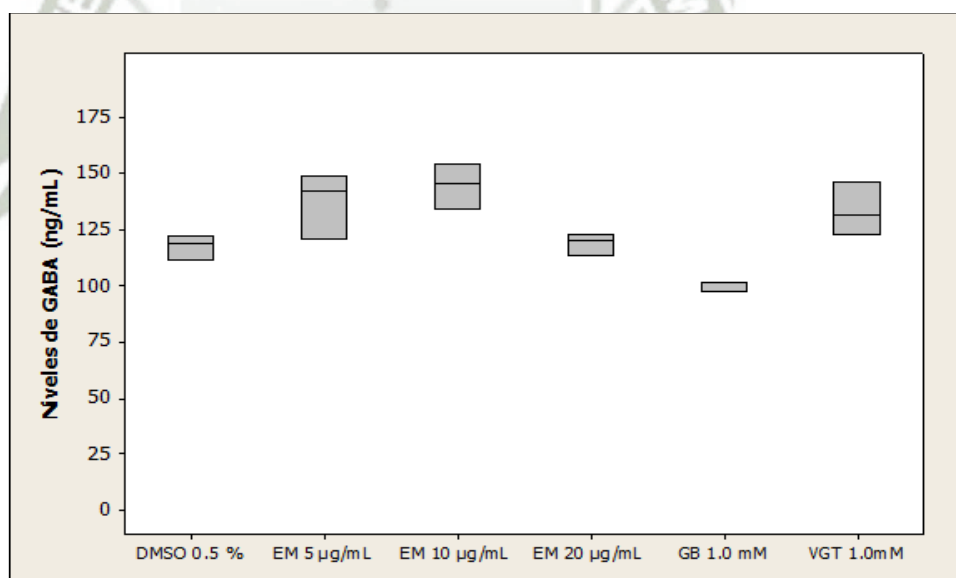


Figura III.12. Efecto de los tratamientos sobre los niveles de GABA producidos por células maduras.

Cabe resaltar que ninguno de los otros dos tratamientos, GB y VGT, mostró resultados significativamente diferentes al control.

Los resultados obtenidos con las diferentes concentraciones del extracto pentánico de maca, demostraron que en este modelo no se obtiene un efecto

dependiente de la concentración, como se puede observar en un modelo con neuronas de cangrejo [31]. Al contrario, se puede observar un gráfico en forma de “v invertida”, que por motivos aún sin dilucidar, la maca tiende a disminuir su efecto si se aumenta la concentración utilizada.

En cuanto al resultado obtenido con la vigabatrina, esta droga no mostró diferencia significativa comparado con el control, se esperó obtener niveles de GABA superiores, como en otras publicaciones [7, 40, 92]. Todos los resultados encontrados en estas investigaciones demostraron que vigabatrina actúa inhibiendo la enzima GABA-T, produciéndose un incremento en los niveles de GABA en el SNC.

4. ENSAYO DE VIABILIDAD DE CÉLULAS

La evaluación de la viabilidad celular de los cultivos fue necesaria para poder descartar una posible malinterpretación de datos, debido a la disminución de la viabilidad en las células, a consecuencia del uso de los tratamientos de las drogas a las concentraciones utilizadas en esta investigación: INH (0.5 y 1.0 mM), VGT (0.1, 0.5 y 1.0 mM), GB (0.5 y 1.0 mM) y EM (5, 10 y 20 µg/mL); cabe recalcar que en este ensayo se utilizó un control que constó de DMSO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%.

La línea celular neuroblastoma B35 se incubó las células durante 24 horas con los tratamientos y el control. Después de cumplido este proceso se agregó la solución de MTS y se llevó a incubar durante 3 horas más.

La lectura de la absorbancia se realizó una vez terminadas las 3 horas en un espectrofotómetro de platos a 490 nm. La tabla con las absorbancias obtenidas por el espectrofotómetro, se puede observar en el ANEXO III.

El porcentaje de viabilidad fue estimado al comparar la absorbancia de los pozos con tratamientos, con el promedio de los pozos del control (células sin daño alguno) que se consideró como 100% viable. Los resultados de porcentaje de viabilidad hallados se expresan en la Tabla III.15.

Tabla III.15. Porcentaje de la viabilidad de INH , VGT , EM y GB

	DMSO 0.5%	INH 0.5 m M	INH 1.0 m M	VGT 0.1 m M	VGT 0.5 m M	VGT 1.0 m M	EM 5 ug/m L	EM 10 ug/m L	EM 20 ug/m L	GB 0.5 m M	GB 1.0 m M
n 1	101.99	113.64	101.16	105.61	103.83	93.95	111.44	109.35	120.03	108.97	103.86
n 2	104.95	118.33	95.82	97.71	104.03	96.92	97.19	102.64	102.64	102.75	100.75
n 3	98.33	106.51	97.13	99.29	93.16	93.56	107.25	93.42	97.61	102.98	102.98
n 4	96.93	103.23	100.41	94.74	84.86	88.62	98.66	97.40	102.22	101.64	106.08
n 5	97.80	107.73	102.29	95.73	98.30	90.59	96.14	93.84	98.45	106.08	108.75
Media	100.00	109.89	99.36	98.62	96.84	92.73	102.14	99.33	104.19	104.48	104.48
Desv. Est.	3.37	6.04	2.76	4.29	8.06	3.21	6.80	6.71	9.13	3.00	3.05
ESM	1.51	2.70	1.23	1.92	3.60	1.44	3.04	3.00	4.08	1.34	1.37

Una vez obtenidos los porcentajes de viabilidad de cada grupo se realizó el análisis de varianza (ANOVA) (tabla III.16) seguido por el test *post hoc* de Dunnet (tabla III.17) con la finalidad de encontrar diferencia significativa en comparación con el grupo control. Se demostró que no existe diferencia significativa en ninguno de los casos (figura III.13); evidenciando de esta manera que los resultados obtenidos en los anteriores ensayos, se deben a los diversos mecanismos de acción de los tratamientos, más no a posibles efectos sobre la viabilidad celular.

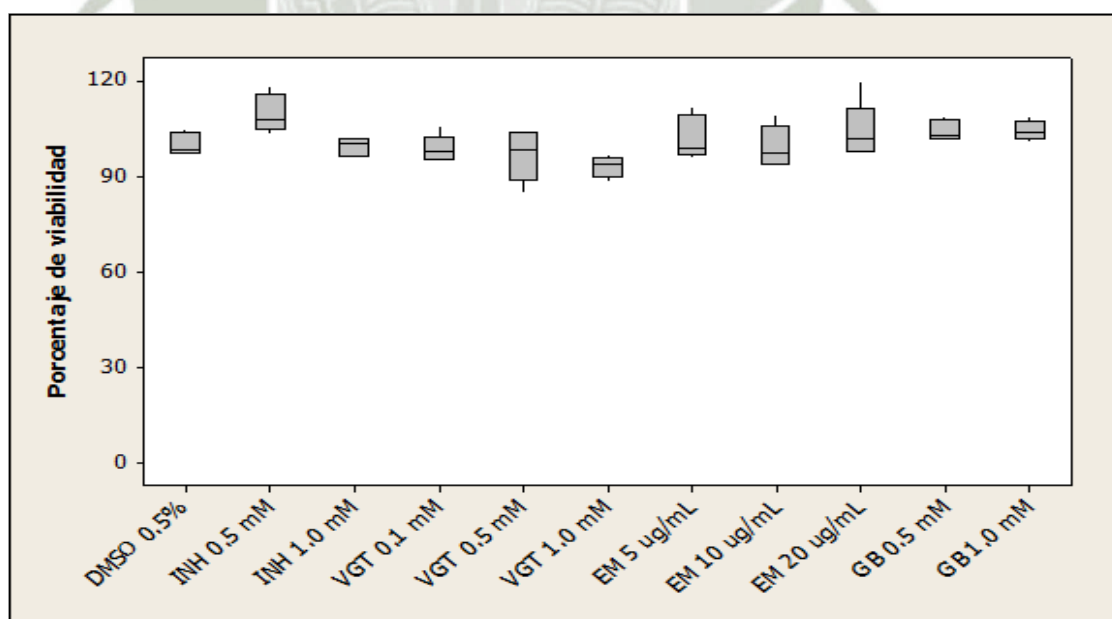


Figura III.13. Efecto de los tratamientos sobre la viabilidad del neuroblastoma B35.

Tabla III.16. ANOVA de los tratamientos sobre la viabilidad del neuroblastoma B35.

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Factor	10	1062.7	106.3	3.42	0.002
Error	44	1368.4	31.1		
Total	54	2431.0			

Fuente: *Minitab 16*.

Tabla III.17. Test *post hoc* de Dunnet de los tratamientos sobre la viabilidad del neuroblastoma B35.

Nivel	N	Media	Agrupación
DM SO 0.5% (control)	5	100.000	A
INH 0.5 m M	5	109.886	A
GB 1.0 m M	5	104.485	A
GB 0.5 m M	5	104.485	A
EM 20 ug/m L	5	104.191	A
EM 5 ug/m L	5	102.137	A
INH 1.0 m M	5	99.362	A
EM 10 ug/m L	5	99.329	A
VGT 0.1 m M	5	98.617	A
VGT 0.5 m M	5	96.838	A
VGT 1.0 m M	5	92.727	A

Fuente: *Minitab 16*.

Las medias no etiquetadas con la letra A son significativamente diferentes de la media del nivel de control.

Se eligió el ensayo de MTS para determinar la viabilidad, pues es un método bastante sencillo y confiable. Este método viene siendo utilizado en varios estudios para este fin, obteniéndose buenos resultados como los presentados en previas investigaciones [17, 31].



CONCLUSIONES.

1. La línea celular neuroblastoma B35 es capaz de producir GABA en medio de cultivo DMEM con 10 % de FBS, incubado a 37°C en una atmósfera aeróbica con 5% CO₂.
2. Se pudo cuantificar el neurotransmisor GABA diariamente, mediante HPLC-ED por medio de un proceso de derivatización pre-columna utilizando OPA/SO₃⁻². Se determinaron muestras dentro de un rango de 20 a 100 ng/mL, obteniéndose un R²= 0.9983.
3. Se demostró que la INH (0.5 y 1.0 mM), GB (0.5 y 1.0 mM) y VGT (0.1 y 0.5 mM) disminuyen los niveles de GABA producidos por el neuroblastoma B35 en 48 horas de incubación. Por otro lado, EM (20 µg/mL) aumentó significativamente estos niveles comparados con un control (DM SO 0.5% disuelto en NaCl 0.9%).
4. GB (1.0 mM) pudo contrarrestar significativamente el efecto inhibitorio producido por INH (0.5 mM) sobre los niveles de GABA.
5. El extracto pentánico de *Lepidium meyenii* L. a una concentración de 10 µg/mL demostró el aumento de los niveles de GABA producidos por neuroblastoma B35 después de 96 horas de incubación habiendo sido administrado después de las primeras 48 horas.
6. No se encontró evidencia, a partir de los resultados del ensayo de viabilidad con MTS, de que los tratamientos utilizados produjeran alteraciones en el normal desarrollo del neuroblastoma B35.

SUGERENCIAS.

1. Determinar que isoforma de GAD posee el neuroblastoma B35, para esto se recomienda ensayos de inmunofluorescencia con anticuerpos antiGAD₆₅ o antiGAD₆₇.
2. Demostrar la ausencia o presencia de la enzima GABA-T y glutaminasa, ya que son necesarias para la investigación de fármacos que actúan sobre el sistema GABAérgico.
3. Realizar ensayos *in vivo* administrando diversas dosis de extracto pentánico de *Lepidium meyenii L.* para cuantificar GABA en zonas específicas del cerebro por técnicas de microdialisis.
4. Utilizar Neuroblastoma B35 como modelo farmacológico en fármacos de origen sintético y natural que se sospeche actúan sobre el sistema GABAérgico.
5. Realizar ensayos electrofisiológicos a Neuroblastoma B35, para determinar más características de esta línea celular.



REFERENCIAS.

REFERENCIAS

1. Olsen, R.; Betz, H. "*GABA and Glicine*" Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects, seventh edition, 2006, pp. 291-301.
2. Maher, T. "*Amino Acid Neurotransmitter in the Central Nervous System*" Foye's principles of Medicinal Chemistry, sixth edition, 2008, pp. 444-461.
3. Olsen, R. "*GABA*" Neuropsychopharmacology - fifth Generation of Progress, fifth edition, 2002, pp. 159-168.
4. Otey CA, Boukhelifa M, Maness P. "*B35 neuroblastoma cells: An easily transfected, cultured cell model of central nervous system neurons*" Methods Cell Biology, 2003(71), pp. 287-304.
5. Viores, S.; Marangos, P.; Bonnin J.; Rubinstein, L. "*Inmunoradiometric and immunohistochemical demonstration of neuron-specific enolase in experimental rat gliomas*" Cancer Research, 1984(44), pp. 2595-2599.
6. Schubert, D.; Heinemann, S.; Carlisle, W.; Tarikas, H.; Kimes, B.; Patrick, J.; Steinbach, H.; Culp, W.; Brandt, B. "*Clonal cell lines from the rat central nervous system*" Nature, 1974(249), pp. 224-227.
7. Jung MJ, Lippert B, Metcalf BW et al. "*Gamma-vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: effects on brain GABA metabolism in mice*". Neurochemistry 1977;29:797-802.
8. Sutton, K. S., Chung, F.-Z., Pinnock, R. D., Lee, K., Maneuf, Y. P., Gonzalez, M. I. "*Cellular and molecular action of the putative GABA-mimetic, gabapentin*" Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 2003 (60), pp. 742-750.
9. Taylor C. P. "*Mechanisms of action of new antiepileptic drugs. In: New Trends in Epilepsy Management: The Role of Gabapentin*" Royal Society of Medicine, 1993, pp. 13-40.
10. Foot M. and Wallace J. "*Gabapentin*". Epilepsy Research Supplement, 1992, pp. 3109-3114.

11. Goldust, A.; Su, T.; Welty, D.; Taylor, C.; Oxender, D. "Effects of anticonvulsant drug gabapentin on the enzymes in metabolic pathways of glutamate and GABA" *Epilepsy Research*, 1995 (22), pp. 1-11.
12. Ruffmann C, Bogliun G, Beghi E "Epileptogenic drugs: a systematic review". *Expert Review in Neurotherapy*, 2006 (6), pp. 575-589.
13. Vergnes M, Boehrer A, Reibel S, Simler A, Marescaux C "Selective susceptibility to inhibitors of GABA synthesis and antagonists of GABA receptor in rats with genetic absence epilepsy". *Exp Neurol* 2000(161), pp. 714-723.
14. Idrissi, E.; L'Amoreaux, W. "Selective resistance of taurine-fed mice to isoniazide-potentiated seizures: in vivo functional test for the activity of glutamic acid decarboxylase" *Neuroscience*, 2008(156), 693-699.
15. Gonzales, G. "Ethnobiology and ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a plant from the peruvian Highlands". *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, pp. 1-10.
16. Pino-Figueroa, A.; Bohlke, M.; Maher, T. "Lepidium meyenii (Maca): a Review on its Phytochemical and Pharmacological Profile" *Mechanism and action of phytoconstituents*, 2011, pp. 9-27.
17. Pino-Figueroa, A.; Vu, H.; Kelley, Ch.; Maher, T. "Mechanism of action of *Lepidium meyenii* (Maca): An explanation for its neuroprotective activity". *American Journal of Neuroprotection and Neuroregeneration*, 3, 2011, pp. 1-6.
18. Taboada, K.; Tejeda, A. "Estudio del efecto anticonvulsivante del extracto pentánico de *Lepidium peruvianum Chacón sp.* (Maca) en ratas con epilepsia inducida por pilocarpina". Tesis para la obtención del título de Químico Farmacéutico, Universidad Católica de Santa María, 2013.
19. Wang, L.; Maher, T.; Wurman, R. "Oral l-Glutamine increases GABA levels in striatal tissue and extracellular fluid" *The FASEB Journal*, 2007, pp. 1227-1332.
20. Buddhala, Ch.; Hsu, Ch.; Wu, J. "A novel mechanism for GABA synthesis and packaging in synaptic vesicles" *Neurochemistry International*, 2009 (55), pp. 9-12.

21. Roth, F.; Draguhn, A. "GABA metabolism and transport: Effects on synaptic efficacy" *Neural Plasticity*, 2012, pp. 1-12.
22. Rowley, N.; Madsen, K.; Schousboe, A.; White, S. "Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure controls" *Neurochemistry International*, 2012 (61), pp. 546-558.
23. Brunton, L. "Farmacoterapia de las epilepsias" Goodman y Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica, onceava edición, 2006.
24. Ben-Menachem, E. "Mechanism of Action of Vigabatrin: correcting misperceptions". *Acta Neurologica Scandinavica*, 2011 (124), pp. 5-15.
25. Martin, I.; Dunn, S. "GABA Receptors" *TOCRIS Reviews*, 2002 (20), pp. 1-8.
26. Bormann, J. "The 'ABC' of GABA receptors" *Trends in Pharmacological Sciences*, 2000 (21), pp. 16-19.
27. Schubert, D. "The uptake of GABA by clonal nerve and glia" *Brain Research*, 1975 (84), pp. 87 - 98.
28. Sonnewald, U.; Kortner, T.; Qu, H.; Olstad, E.; Suñol, C.; Bak, L.; Schousboe, A.; Waagepetersen, H. "Demonstration of extensive GABA synthesis in the small population of GAD positive neurons in cerebellar cultures by the use of pharmacological tools" *Neurochemistry International*, 2006 (48), pp. 572-578.
29. Sonnewald, U.; Olstad, E.; Qu, H.; Babot, Z.; Cristofol R.; Suñol, C.; Schousboe, A.; Waagepetersen, H. "First direct demonstration of extensive GABA synthesis in mouse cerebellar neuronal cultures" *Journal of Neurochemistry*, 2004 (91), pp. 796 - 803.
30. Sarang SS, Yoshida T, Cadet R, Valeras AS, Jensen RV, Gullans SR. "Discovery of molecular mechanisms of neuroprotection using cell-based bioassays and oligonucleotide arrays" *Physiological Genomics*, 2002 (11), pp. 45-52.
31. Pino-Figueroa, A., Nguyen, D. and Maher, T. J. "Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca)" *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2010 (1199), pp. 77-85
32. Liu CS, Chen NH, Zhang JT. "Protection of PC12 cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity by salvianolic acid B, a new compound isolated from *radix salviae miltiorrhizae*" *Phytomedicine*, 2007 (14), pp. 492-497.

33. ATCC (www.atcc.org)
34. Povlsen, G.; Ditlevsen, D.; Berezin, V.; Bock, E. "Intracellular signaling by the Neural Cell adhesion molecule" *Neurochemical Research*, 2003(28), pp. 127-141.
35. Kasckow, J.; Tillakaratne, N.; Kim, H.; Strecker, G.; Tobin, A.; Olsen, R. "Expression of GABA_A receptors polypeptides in clonal rat cell lines" *Brain Research*, 1992(581), pp. 143-147.
36. Tyndale, R.; Hales, T.; Olsen, R.; Tobin, A. "Distinctive Patterns of GABA_A Receptor Subunit mRNAs in 13 Cell Lines" *The Journal of Neuroscience*, 1994(14), pp. 5417-5428.
37. Ban TA. "The role of serendipity in drug discovery" *Dialogues in Clinical Neurosciences*, 2006 (8), pp. 335-344.
38. Schechter PJ, Tranier Y. "Effect of elevated brain GABA concentrations on the actions of bicuculline and picrotoxin in mice" *Psychopharmacology (Berl)* 1977 (54), pp.145-148.
39. Howland RH. "Serendipity and psychopharmacology" *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*, 2010 (48), pp. 9-12.
40. Grove J, Fozard JR, Mamont PS. "Assay of alpha-difluoromethylornithine in body fluids and tissues by automatic amino-acid analysis" *Journal of Chromatography*, 1981 (223), pp. 409-416.
41. Mumford JP, Dam M. "Meta-analysis of placebo-controlled studies of vigabatrin in drug-resistant epilepsy" *British Journal of Clinical Pharmacology* 1989 (27), pp. ;27:101S-7S 67.
42. Ben-Menachem E, Persson L, Schechter PJ et al. "Effects of single doses of vigabatrin on CSF concentrations of GABA, homocarnosine, homovanillic acid and 5-hydroxyindolacetic acid in patients with complex partial seizures" *Epilepsy Research*, 1988 (2), pp. 96-101.
43. Goa K. L. and Sorkin E. M. (1993) "Gabapentin: a review of its pharmacological properties and clinical potential in epilepsy" *Drugs*, 1993 (46), pp. 409-427.
44. Ramsay R. E. (1994) "Clinical efficacy and safety of gabapentin" *Neurology*, 1994 (44), pp. S23-S30

45. Crawford P. M. (1996) "*The clinical efficacy of Gabapentin*" Review of Contemporary Pharmacotherapy, 1996 (7), pp. 215-225
46. Suman-Chauhan N., Webdale L., Hill D. R. and Woodruff N. "*Characterisation of [3H] gabapentin binding to a novel site in rat brain: homogenate binding studies*" Eur. J. Pharmacol. 1993 (244), pp. 293-301.
47. Taylor C. P., Gee N. S., Su T. Z., Kocsis J., Welty D. F., Brown J. P. et al. "*A summary of mechanistic hypotheses of gabapentin pharmacology*" Epilepsy Research, 1998 (29), pp. 233-249.
48. Goldlust A., Su T., Welty D. F., Taylor C. P. and Oxender D. L. "*Effects of the anticonvulsant drug gabapentin on enzymes in the metabolic pathways of glutamate and GABA*" Epilepsy Research, 1995 (22), pp. 1-11.
49. Taylor C. P., Vartanian M. G., Andruszkiewicz R. and Silverman R. B. "*3-Alkyl GABA and 3-alkylglutamic acid analogues: two new classes of anticonvulsant agents*" Epilepsy Research, 1992 (11), pp. 103-110
50. Mattson R. H., Rothman D. L., Behar K. L. and Petroff O. A. C. "*Gabapentin: A GABA active drug*" Epilepsia, 1997 (38), pp. 65-66
51. Gupta S K, Bedi RS, Maini V K. "*Epileptiform seizures with single conventional dose of isoniazid.*" Indian J Tuberc 1984; 31:19-21.
52. Patel Shani Dushyantbhai "*Stability indicating *rp-lc* assay method development & validation for rifampicin and isoniazid tablets*". Department of quality assurance, Kleu's college of pharmacy, Belgaum -590010, karnataka, India, 2011; 26-27.
53. Wood JD, Peesker SJ. "*The effect on GABA metabolism in brain of isonicotinic acid hydrazide and pyridoxine as a function of time after administration.*" Journal of Neurochemistry, 1972(19), pp. 1527-1537.
54. Dini, A.; Migliuolo, G.; Rastrelli, L.; Saturnino, P; Schettino, O. "*Chemical composition of *Lepidium meyenii**" Food Chemistry, 1994 (49), pp. 347-349.
55. Valerio, L.; Gonzales, G. "*Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis*" Toxicological Reviews. 2005 (24), pp. 11-35.
56. Muhammad, I.; Zhao, J.; Dunbar, D.; Khan, I. "*Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca'*" Phytochemistry, 2002 (59), pp. 105-110.

57. Cui, B.; Zheng, B.; He, Z.; Zheng, Q. "Imidazole alkaloids from *Lepidium meyenii*" *Journal of Natural Products*, 2003 (66), pp. 1101-1103.
58. Cao, R.; Peng, W.; Wang, Z.; Xu, A. " β -Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological functions" *Current Medicinal Chemistry*, 2007 (14), pp. 479-500.
59. Gonzales, G.; Gonzales-Casteñeda, C. "*The Methyltetrahydro- β -Carbolines in Maca (*Lepidium meyenii*)*" Advance Acces Pulication, 2008.
60. Piacente, S.; Carbone, V.; Plaza, A.; Zampelli, A.; Pizza, C. "Investigation of the Tuber Constituents of *Maca (Lepidium meyenii Walp.)*" *Journal of Agricultural and food chemistry*, 2002 (50), pp. 5621-5625.
61. Wu, H.; Kelley, C.; Pino-Figueroa, A.; Vu, H.; Maher, T. "Macamides and their synthetic analogs: Evaluation of *in vitro* FAAH inhibition" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013 (21), pp. 5188-5197.
62. Tellez, M.; Khan, I.; Kobaisy, M.; Schrader, K.; Dayan, F.; Osbrink, W. "Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii (Walp.)*" *Phytochemistry*, 2002 (61), pp. 149-155.
63. Rubio, J.; Caldas, S.; D'ávila; Gasco, M.; Gonzales, G. "Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii (Maca)* on learning and depression in ovariectomized mice" *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2006 (6).
64. Niessen, W.; Van der Greef, J. "*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*", Marcel Dekker Inc, New York, (1992), 3-30
65. J.H. Knox, J.N. Done, A.F. Fell, M.T. Gilbert, "*HPLC*", William slow, Cheshire, (1977), 1-90
66. R.J Hamilton, P.A Sewell, "*Introduction to high performance Liquid Chromatography*", 2nd Edition, Chapman and Hall, London, (1977), 10-46
67. S. Lindsay, D. Kealey, "*High Performance Liquid Chromatography*", John Wiley and Sons, New York, (1987), 15
68. Scott, R.P.W. "*Liquid Chromatography for the analyst*", Chromatographic Science series, Volume 67, Marcel Dekker, (1994), 40-196
69. Horvath, C. "*High Performance Liquid Chromatography*", Advances and Perspectives, Volume 4, Academic Press, New York (1986), 4 13

70. Simpson, C.F.; Knox, J.H. *“Practical High Performance Liquid Chromatography”*, Wiley-Interscience, New York, (1976), 47.
71. Engelhardt, H. *“Practice of High Performance Liquid Chromatography Applications”*, Equipment and Quantitative Analysis, Springer-Verlag, Berlin, (1986), 11-26.
72. Yeung, E.S. *“Detectors for LC”*, Volume 89 in Chemical Analysis, John Wiley and Sons, New York, (1986), 42.
73. Runser, D.J. *“Maintaining and troubleshooting HPLC system”*, John Wiley and Sons, New York, (1981), 1- 109
74. <http://www.myantec.com/>
75. Ian N. Acworth and Bruce A. Bailey. *“Extending the Usefulness of HPLC with Electrochemical Detection”*. Thermo Fisher Scientific, Chelmsford, MA, USA.
76. Acworth, I.N.; Waraska, J. *“Electrochemical measurement of electrochemically unreactive compounds: An examination of the use of derivatives and photolysis HPLC and coulometric detection. In: Coulometric electrode array detectors for HPLC.”* Progress in HPLC-HPCE Acworth, I.N., Naoi, M., Parvez, H., Parves, S. Eds., VSP, 1997, 6, 351-376.
77. Customer HiLite. *“Fast Analysis of GABA”* ESA, inc.
78. Rowley, H.; Martin, K.; Marsden, C. *“Determination of in vivo amino acid neurotransmitters by high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde-sulphite derivatisation”* Journal of Neurosciences Methods, 1995 (57), pp. 93-99.
79. Shah, A.; Crespi, F.; Heidbreder, C. *“Amino acid neurotransmitters: separation approaches and diagnostic value”* Journal of Chromatography B, 2002 (5), pp. 151-163.
80. Rea, K.; Cremers, T.; Westerink, B. *“HPLC conditions are critical for the detection of GABA by microdialysis”* Journal of Neurochemistry, 2005 (94), pp. 672-679.
81. Monge-Acuña, A.; Fornaguera-Trías, J. *“A high performance liquid chromatography method with electrochemical detection of gamma-aminobutyric acid, glutamate and glutamine in rat brain homogenates”* Journal of Neuroscience Methods, 2009 (183), pp. 176-181.

82. Leach, J.; Sills, G.; Butler, E.; Forrest, G.; Thompson, G.; Brodie, M. *“Neurochemical actions of gabapentin in mouse brain”* Epilepsy Research, 1997 (27), pp. 175-180.
83. Albrecht, J.; Sonnewald, U.; Waagepetersen, H.; Schousboe, A. *“Glutamine in the central nervous system: function and dysfunction”* Frontiers in Bioscience, 2007 (12), pp. 332-343-
84. Bak, L.; Schousboe, A.; Waagepetersen, H. *“The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer”*. Journal of Neurochemistry, 2006 (98), pp. 641-653.
85. Gloss, D.; Vickrey, B. *“Cannabinoids for epilepsy (Review)”* The Cochrane Library, 2012 (06).
86. Assaf, F.; Fishbein, M.; Gafni, M.; Keren, O.; Same, Y. *“Pre- and post-conditioning treatment with an ultra-low dose of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) protects against pentylenetetrazole (PTZ)-induced cognitive damage”* Behavioural Brain Research, 2011 (220), pp. 194-201.
87. Jones, N.; Glyn, S.; Akiyama, S.; Hill, T.; Hill, A.; Weston, S.; Burnett, M.; Yamasaki, Y.; Stephens, G.; Whalley, B.; Williams, C. *“Cannabidiol exerts anti-convulsant effects in animal models of temporal lobe and partial seizures”*. Seizure, 2012 (21) pp. 344-352.
88. Clausen, R.; Moltzen, E.; Perregaard, J.; Lenz, S.; Sanchez, C.; Falch, E.; Frølund, B.; Bolvig, T.; Sarup, A.; Larsson, O.; Schousboe, A.; Krogsgaard-Larsen, P. *“Selective inhibitors of GABA uptake: synthesis and molecular pharmacology of 4-N-methylamino-4,5,6,7-tetrahydronebzol[disoxazol-3-ol analogues”* Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2005 (13), pp. 895-908.
89. Carta, M.; Murru, L.; Barabino, E.; Talani, G.; Sanna, E.; Biggio, G. *“Isoniazid-induced reduction in gabaergic neurotransmission alters the function of the cerebellar cortical circuit”* Neuroscience, 2008 (154), pp. 710-719.
90. Patil, M.; Patil, C.; Patil, S.; Jadhav, R. *“Anticonvulsant activity of aqueous root extract of Ficus religiosa”* Journal of Ethnopharmacology, 2011 (133), pp. 92-96.

91. Maneuf, Y.; Gonzales, M.; Sutton, K.; Chung, F.; Pinnock, R.; Lee, K. "Cellular and molecular action of the putative GABA-mimetic, gabapentin" *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003 (60), pp. 742-750.
92. Ben-Menachem E, Mumford J, Hamberger A. "Effect of long-term vigabatrin therapy on GABA and other amino acid concentrations in the central nervous system - a case study". *Epilepsy Research*, 1993(16), pp. 241-3.81.
93. Klegeris, A., Bissonnette, C. J., & McGeer, P. L. (2003). "Reduction of human monocytic cell neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB2 receptor." *British Journal of Pharmacology*, 139(4), pp. 775-786.



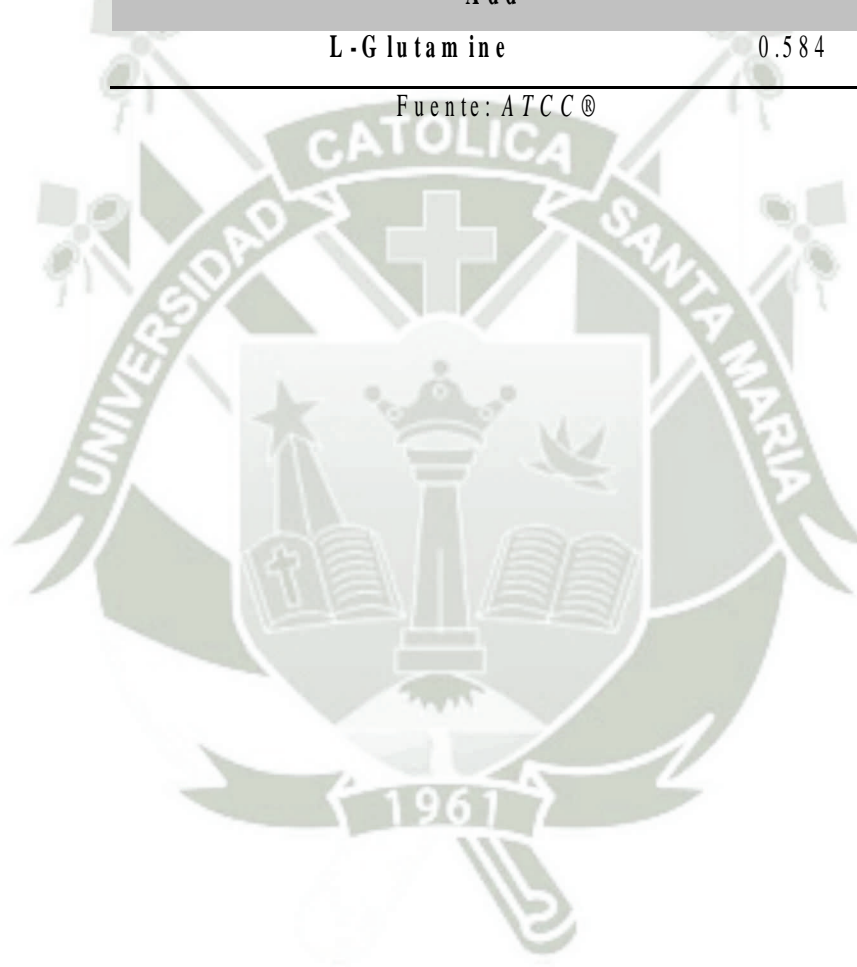


ANEXO I. COMPOSICIÓN DE MEDIO DMEM.

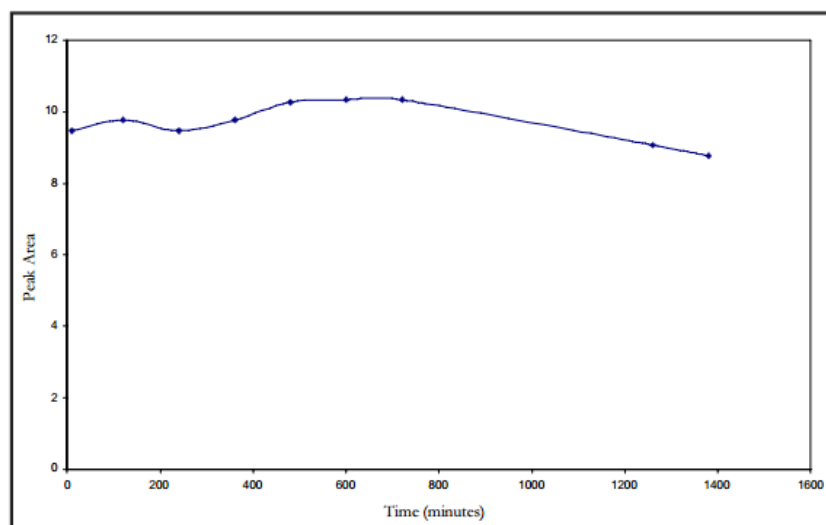
Component	g/L
Inorganic Salts	
Calcium Chloride	0.2
Ferric Nitrate • 9H ₂ O	0.0001
Magnesium Sulfate (anhydrous)	
Potassium Chloride	0.4
Sodium Bicarbonate	3.7
Sodium Chloride	6.4
Sodium Phosphate Monobasic (anhydrous)	0.109
L-Arginine • HCl	0.084
L-Cystine • 2HCl	—
Glycine	0.03
L-Histidine • HCl • H ₂ O	0.042
L-Isoleucine	0.105
L-Leucine	0.105
L-Lysine • HCl	1.46
L-Methionine	—
L-Phenylalanine	0.066
L-Serine	0.042
L-Threonine	0.095
L-Tryptophan	0.016
L-Tyrosine • 2Na • 2H ₂ O	0.10379
L-Valine	0.094
Vitamins	
Choline Chloride	0.004
Folic Acid	0.004
<i>myo</i> -Inositol	0.0072
Niacinamide	0.004
D-Pantothenic Acid (hemicalcium)	0.004

Pyridoxal • H Cl	—
Pyridoxine • H Cl	0.004
Riboflavin	0.0004
Thiamine • H Cl	0.004
Other	
D-Glucose	
Phenol Red • Na	0.0159
Pyruvic Acid • Na	0.11
Add	
L-Glutamine	0.584

Fuente: ATCC®



ANEXO II. ESTABILIDAD DE GABA



Estabilidad del derivado GABA - OPA/SO₃⁻² a temperatura ambiente.

Fuente: *Fast Analysis of GABA*.



ANEXO III. TABLA DE ABSORBANCIAS DEL ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

	DMSO [0.5%]	INH05 nM	INH10 nM	VGF [0.1nM]	VGF [0.5nM]	VGF [1.0nM]	EM5 ug/ml	EM10 ug/ml	EM20 ug/ml	CB[05 nM	CB[10 nM
n1	0.585	0.652	0.68	0.5344	0.5254	0.4754	0.5318	0.5218	0.5728	0.4908	0.4678
n2	0.602	0.626	0.667	0.4944	0.5264	0.4904	0.4638	0.4898	0.4898	0.4628	0.4538
n3	0.564	0.566	0.584	0.5024	0.4714	0.4734	0.5118	0.4458	0.4658	0.4638	0.4638
n4	0.556	0.59	0.653	0.4794	0.4294	0.4484	0.4708	0.4648	0.4878	0.4578	0.4778
n5	0.561	0.581	0.632	0.4844	0.4974	0.4584	0.4588	0.4478	0.4698	0.4778	0.4898
Mda	0.574	0.603	0.643	0.499	0.490	0.469	0.487	0.474	0.497	0.471	0.471
Desviación Estándar	0.019	0.035	0.038	0.022	0.041	0.016	0.032	0.032	0.044	0.014	0.014
ESM	0.009	0.016	0.017	0.010	0.018	0.007	0.015	0.014	0.019	0.006	0.006
Porcentaje	100.00	105.13	112.13	98.62	96.84	92.73	102.14	99.33	104.19	104.48	104.48

Fuente: *Elaboración propia*

ANEXO IV. TABLAS DE TEST DE DUNNET.

G1	p<	Número de grupos incluidos el grupo control.								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	0.05	2.57	3.03	3.29	3.48	3.62	3.73	3.82	3.9	3.97
	0.01	4.03	4.63	4.98	5.22	5.41	5.56	5.69	5.8	5.89
6	0.05	2.45	2.86	3.1	3.26	3.39	3.49	3.57	3.64	3.71
	0.01	3.71	4.21	4.51	4.71	4.87	5	5.1	5.2	5.28
7	0.05	2.36	2.75	2.97	3.12	3.24	3.33	3.41	3.47	3.53
	0.01	3.5	3.95	4.21	4.39	4.53	4.64	4.74	4.82	4.89
8	0.05	2.31	2.67	2.88	3.02	3.13	3.22	3.29	3.35	3.41
	0.01	3.36	3.77	4	4.17	4.29	4.4	4.48	4.56	4.62
9	0.05	2.26	2.61	2.81	2.95	3.05	3.14	3.2	3.26	3.32
	0.01	3.25	3.63	3.85	4.01	4.12	4.22	4.3	4.37	4.43
10	0.05	2.23	2.57	2.76	2.89	2.99	3.07	3.14	3.19	3.24
	0.01	3.17	3.53	3.74	3.88	3.99	4.08	4.16	4.22	4.28
11	0.05	2.2	2.53	2.72	2.84	2.94	3.02	3.08	3.14	3.19
	0.01	3.11	3.45	3.65	3.79	3.89	3.98	4.05	4.11	4.16
12	0.05	2.18	2.5	2.68	2.81	2.9	2.98	3.04	3.09	3.14
	0.01	3.05	3.39	3.58	3.71	3.81	3.89	3.96	4.02	4.07
13	0.05	2.16	2.48	2.65	2.78	2.87	2.94	3	3.06	3.1
	0.01	3.01	3.33	3.52	3.65	3.74	3.82	3.89	3.94	3.99
14	0.05	2.14	2.46	2.63	2.75	2.84	2.91	2.97	3.02	3.07
	0.01	2.98	3.29	3.47	3.59	3.69	3.76	3.83	3.88	3.93
15	0.05	2.13	2.44	2.61	2.73	2.82	2.89	2.95	3	3.04
	0.01	2.95	3.25	3.43	3.55	3.64	3.71	3.78	3.83	3.88
16	0.05	2.12	2.42	2.59	2.71	2.8	2.87	2.92	2.97	3.02
	0.01	2.92	3.22	3.39	3.51	3.6	3.67	3.73	3.78	3.83
17	0.05	2.11	2.41	2.58	2.69	2.78	2.85	2.9	2.95	3
	0.01	2.9	3.19	3.36	3.47	3.56	3.63	3.69	3.74	3.79
18	0.05	2.1	2.4	2.56	2.68	2.76	2.83	2.89	2.94	2.98

	0.01	2.88	3.17	3.33	3.44	3.53	3.6	3.66	3.71	3.75
19	0.05	2.09	2.39	2.55	2.66	2.75	2.81	2.87	2.92	2.96
	0.01	2.86	3.15	3.31	3.42	3.5	3.57	3.63	3.68	3.72
20	0.05	2.09	2.38	2.54	2.65	2.73	2.8	2.86	2.9	2.95
	0.01	2.85	3.13	3.29	3.4	3.48	3.55	3.6	3.65	3.69
24	0.05	2.06	2.35	2.51	2.61	2.7	2.76	2.81	2.86	2.9
	0.01	2.8	3.07	3.22	3.32	3.4	3.47	3.52	3.57	3.61
30	0.05	2.04	2.32	2.47	2.58	2.66	2.72	2.77	2.82	2.86
	0.01	2.75	3.01	3.15	3.25	3.33	3.39	3.44	3.49	3.52
40	0.05	2.02	2.29	2.44	2.54	2.62	2.68	2.73	2.77	2.81
	0.01	2.7	2.95	3.09	3.19	3.26	3.32	3.37	3.41	3.44
60	0.05	2	2.27	2.41	2.51	2.58	2.64	2.69	2.73	2.77
	0.01	2.66	2.9	3.03	3.12	3.19	3.25	3.29	3.33	3.37

